

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BIOQUÍMICA

EFEITOS *IN VITRO* DO ÁCIDO ISOVALÉRICO E DA
ISOVALERILGLICINA SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS
JOVENS

ALEXANDRE FRANCISCO SOLANO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre, 2008.

**EFEITOS *IN VITRO* DO ÁCIDO ISOVALÉRICO E DA ISOVALERILGLICINA
SOBRE VÁRIOS PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÓRTEX
CEREBRAL DE RATOS JOVENS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas - Bioquímica da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Bioquímica.**

Mestrando: Alexandre Francisco Solano

Orientador: Prof. Dr. Moacir Wajner

Porto Alegre, 2008.

*“É preferível não pensar acerca da verdade do
que fazê-lo sem método”.*
René Decartes – (1596-1650)

AGRADECIMENTOS

A todos professores e servidores do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação, que, desde quando ainda estudava para ingressar no mestrado, tanto me ensinaram e ainda ensinam: Ana Paula, Anelise, Carol, Patrícia, Gustavo, Giórgia, Lucila e Rafa. E o meu primeiro mentor e amigo, “grande” César.

Ao meu colega e “chefinho” Guilhan, visto que, sem ele, teria sido muito difícil chegar ao término deste trabalho a contento. Além do mais, sinto-me honrado porque se tornou um grande amigo e um verdadeiro co-orientador.

A todos os bolsistas, nas pessoas da Ângela, Alana, Anna Laura, Lisi, Carolina e, em especial, do meu xará e amigo, Amaral, pelas tantas vezes que deles precisei e pelo muito que contribuíram para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial à “doce” Bianca, que sempre esteve disposta a ajudar-me, participando ativamente do trabalho desenvolvido e, durante o qual revelou-se possuidora de incomum inteligência e de um talento ímpar para a pesquisa.

A todos colegas do grupo de erros inatos do metabolismo dos laboratórios 34 e 36.

Aos professores do grupo de erros inatos do metabolismo, Ângela, Clóvis e Dutra, pelos sábios ensinamentos.

À minha amiga Lali, pelas horas de paciência, ajuda e incentivo no início deste trabalho.

Ao professor Dr. Moacir, por toda a confiança que depositou em mim, por ter demonstrado excelência na condição de orientador e líder. Além, de ser uma pessoa muito generosa.

Ao casal, Liege e Geraldo, os quais, no início eram apenas meus clientes e que ao longo do tempo se tornaram verdadeiros amigos, me incentivando, apoiando, com muita atenção, amor e carinho. Além disso, pelo quanto sempre têm estado preocupados comigo, pessoal e profissionalmente: sentimentos dignos de mãe e pai.

À madrinha e amiga Heloísa, por ter mostrado o quão é gratificante a profissão de docente.

Aos meus amores, Elisa e Joana (minha princesinha), pelos incontáveis finais de semana em que foram bastante compreensivas comigo. Também pelo amor e carinho incondicionais das duas e, especialmente, pela inesgotável alegria da Joana que sempre enche nossa casa.

À minha mãe e meus irmãos: Vladi, Zinha e André que sempre torceram e acreditaram em mim, ficando felizes a cada realização conquistada.

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Erros Inatos do Metabolismo	5
1.1.1 Acidemias Orgânicas.....	7
1.1.1.1 Acidemia Isovalérica.....	9
1.1.1.1.1 Aspectos Clínicos.....	11
1.1.1.1.2 Metabólitos acumulados.....	13
1.1.1.1.3 Deficiência da enzima e genética.....	14
1.1.1.1.4 Diagnóstico.....	15
1.1.1.1.5 Tratamento.....	17
1.1.1.1.6 Fisiopatologia.....	18
1.2 Radicais livres.....	19
1.2.1 Definição.....	19
1.3 Lipoperoxidação.....	21
1.4 Defesas antioxidantes.....	23
1.5 Estresse Oxidativo.....	23
1.6 Estresse Oxidativo e doenças neurodegenerativas.....	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Geral.....	28
2.2 Específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Reagentes.....	30
3.2 Animais.....	30
3.3 Preparação das amostras e incubação.....	30
3.4 Parâmetros de estresse oxidativo.....	31
3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	31

3.4.2 Quimiluminescência.....	32
3.4.3. Glutathiona reduzida (GSH).....	32
3.4.4 Potencial antioxidante total (TRAP).....	33
3.4.4 Reatividade antioxidante total (TAR).....	34
3.4.6 Oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA).....	34
3.4.7 Formação de carbonilas.....	35
3.4.8 Tióis totais.....	36
3.5 Medida de proteínas.....	36
3.6 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	37
4.2. Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens	40
4.3 Efeito de antioxidantes sobre o aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	43
4.4 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	53
4.5 Efeito da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação de glutathiona (GSH) comercial purificada.....	54
4.6 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	56
4.7 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	58

4.8 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação da 2,7-diclorofluoresceína-diacetato em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	60
4.9 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovaleriglicina (IVG) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidríla em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	61
4.10 Efeito in vitro do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de cérebro de ratos jovens.....	64
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÕES.....	74
7 BIBLIOGRAFIA.....	77
LISTA DE FIGURAS.....	85

RESUMO

A acidemia isovalérica é uma doença hereditária neurometabólica causada pela deficiência da atividade da enzima isovaleril-CoA desidrogenase da rota de degradação da leucina. É caracterizada bioquimicamente pelo acúmulo nos tecidos e fluidos biológicos dos pacientes afetados principalmente dos ácidos isovalérico (IVA) e 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA), bem como isovalerilglicina (IVG). Os achados clínicos caracterizam-se fundamentalmente por sintomas neurológicos graves, tais como convulsões, coma e letargia. O presente trabalho teve por objetivo investigar os efeitos *in vitro* do IVA e IVG sobre vários parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida, tendo em vista que os mecanismos envolvidos no dano cerebral dessa doença até o momento são pouco conhecidos e que recentemente foi demonstrado que o 3-OHIVA, também acumulado nas acidúrias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica, induz peroxidação lipídica em córtex cerebral de ratos jovens. Nossos resultados demonstraram que o a IVG, mas não o IVA, aumentou significativamente os níveis de TBA-RS e quimiluminiscência, indicando que este metabólito induz lipoperoxidação *in vitro*. Com a finalidade de investigar se este efeito foi devido à glicina que faz parte da molécula de IVG, testamos o efeito da glicina sobre estes mesmos parâmetros e verificamos que este aminoácido também induziu dano oxidativo lipídico nesta estrutura cerebral de mesma ordem de magnitude que a IVG. Verificamos também que os antioxidantes trolox (vitamina E solúvel), L-NAME, GSH, melatonina, creatina e uma combinação de CAT+SOD nas doses usualmente suplementadas em estudos *in vitro* não foram capazes de impedir o aumento dos níveis de TBA-RS induzido pela IVG. Já a presença de N-acetilcisteína, precursora de GSH, em concentrações usuais preveniu esta peroxidação lipídica *in vitro* induzida por IVG, indicando que o IVG provavelmente provoca um decréscimo das concentrações cerebrais de glutathiona reduzida (GSH) provavelmente secundário à elevada produção de espécies ativas induzida pelo metabólito. Por outro lado, a adição ao meio de incubação de doses altas desses antioxidantes, com exceção da combinação SOD e CAT, preveniu totalmente o aumento do TBA-RS induzido por IVG, indicando uma alta produção de espécies reativas com conseqüente dano oxidativo lipídico. O próximo passo de nossa investigação foi determinar a influência do IVA e IVG sobre a oxidação do DCFH e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). Tanto o IVA, quanto o IVG não alteraram os níveis de DCFH. Por outro lado, o IVA não modificou, enquanto a IVG provocou uma diminuição significativa dos níveis do GSH. Tal efeito não se deveu a uma ação pró-oxidante direta do IVG ou à interferência desse composto na medida dos níveis de GSH. Tais resultados estão de acordo com o fato de que a N-acetilcisteína, substrato para a formação de GSH, foi capaz de prevenir o aumento da lipoperoxidação lipídica induzida pelo IVG. Verificamos também que o IVA e o IVG não afetaram o TRAP e o TAR que representam o potencial antioxidante total e a reatividade antioxidante total, respectivamente. Por outro lado, a IVG não induziu dano oxidativo protéico medido pela oxidação de sulfidrilas e pela formação de carbonilas, enquanto o IVA causou um aumento significativo na formação de carbonilas, sem alterar os níveis de tióis. Concluindo, nossos

resultados indicam que a IVG é o metabólito acumulado na acidemia isovalérica que induz em maior grau estresse oxidativo em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens, enquanto o IVA é capaz de provocar dano oxidativo protéico. Um aumento do estado pró-oxidante e uma menor capacidade antioxidante, representada pelo decréscimo do GSH cerebral, indica que o estresse oxidativo possa representar um mecanismo na fisiopatologia do dano neurológico característico da acidemia isovalérica.

ABSTRACT

Isovaleric acidemia is an inherited neurometabolic disorder caused by isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency. It is biochemically characterized by accumulation of isovaleric acid (IVA) and 3-hydroxyisovaleric acid (3-OHIVA), as well as isovalerylglycine (IVG) in tissues and biological fluids of affected patients. Clinical features are mainly severe neurological symptoms, such as convulsions, coma, lethargy and ataxia. The present work aimed to investigate the in vitro effects of IVA and IVG on various parameters of oxidative stress in cerebral cortex of 30-day-old rats since the mechanisms of brain damage are poorly known in this disease and that recently it was demonstrated that 3-OHIVA, also accumulating in 3-methylglutaconic aciduria and 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria, induces lipid peroxidation in cerebral cortex of young rats. Our results showed that IVG, but not IVA, significantly increased TBA-RS and quimiluminescence, indicating that this metabolite induces lipid peroxidation in vitro. Aiming to evaluate whether this effect was due to glycine that is a component of IVG molecule, we tested the effect of glycine on the same parameters and verified that this amino acid also induced lipid oxidative damage of the same order of magnitude than IVG. We also observed that the antioxidants trolox (soluble vitamin E), L-NAME, GSH, Melatonin, creatine and the combination CAT + SOD at doses usually supplemented in vitro studies were not able to prevent the increase of TBA-RS levels induced by IVG. In contrast, the presence of N-acetylcysteine, precursor of GSH, at usual concentrations, totally prevented IVG-induced increase of TBA-RS levels, indicating that IVG probably provoked a decrease of brain GSH concentrations probably secondary to elevated formation of free radicals by this metabolite. On the other hand, the presence of higher amounts of these antioxidants, except the combination SOD + CAT, totally prevented the increase of TBA-RS elicited by IVG, indicating that a high production of reactive species with consequent lipid oxidative damage. The next step of our investigation was to determine the influence of IVA and IVG on DCFH-DA oxidation and on GSH levels. Both IVA and IVG did not alter DCFH-DA levels, whereas IVG caused a significant decrease of GSH levels. This effect was not due to a direct pro-oxidant action of IVG or due to IVG interference in the reaction used to measure GSH. Such effects are in line with those showing that N-acetylcystein, the substrate of GSH formation, was able to prevent the increase of lipid peroxidation elicited by IVG. We also found that IVA and IVG did not affect TRAP and TAR that represent total tissue antioxidant potential and total antioxidant reactivity, respectively. On the other hand, IVG did not provoke protein oxidative damage measured by sulfhydryl oxidation and carbonyl formation, whereas IVA causes a significant increase of carbonyl formation, without altering thiol concentration. Concluding, our findings indicate that IVG is the accumulating metabolite in isovaleric acidemia that induces in higher degree oxidative stress in cortical homogenates from young rats, while IVA is able to provoke protein oxidative damage. An increase of pro-oxidant status and a lower antioxidant capacity, represented by a decrease of cerebral GSH, indicate that oxidative stress may represent a mechanism in the pathophysiology of the brain damage characteristic of isovaleric acidemia.

LISTA DE ABREVIATURAS

3- OHIVA – ácido 3-hidroxiisovalérico
ABAP - 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano)
ANOVA – análise de variância de uma via
CG - cromatografia gasosa
DCF - 2, 7-diclorofluoresceína
DCFH-DA - diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA – ácido etileno-diamino-tetra-acético
EIM – erros inatos do metabolismo
ERN – espécies reativas de nitrogênio
ERO – espécies reativas de oxigênio
GLI – glicina; ácido aminoacético
GSH – glutathiona reduzida
GSSG – glutathiona oxidada
IVA – ácido isovalérico
IVG – isovalerilglicina
L-NAME – N^ω-nitro-L-argininametiléster
LOOH – hidroperóxido lipídico
LOO[•] – radical peroxila
NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
SPSS – pacote estatístico para ciências sociais
TAR – reatividade antioxidante total
TBA – ácido tiobarbitúrico
TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP – potencial antioxidante total
TRO – trolox

1. INTRODUÇÃO

1.1 Erros inatos do metabolismo

O termo erros inatos do metabolismo (EIM) foi utilizado pela primeira vez por Archibald Garrod em 1908, durante estudos realizados com pacientes com alcaptonúria, doença em que os pacientes afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. O pesquisador observou que, freqüentemente, um ou mais indivíduos da mesma família demonstravam ser afetados sem que seus pais ou demais parentes apresentassem a doença. Baseado também na observação da maior incidência de consangüinidade entre os pais dos pacientes e nas leis de Mendel, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da determinação do ácido homogentísico na urina de pacientes com alcaptonúria e da observação de que esta substância era um metabólito normal da degradação da tirosina, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido homogentísico até fumarato e acetoacetato. Verificou-se mais tarde que tais alterações resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não (SCRIVER *et al.*, 2001).

Atualmente, mais de 500 erros inatos do metabolismo foram descritos, a maioria, envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (SCRIVER *et al.*, 2001).

Os pacientes portadores de algum tipo de EIM apresentam sintomatologia muito variada e inespecífica, mesmo entre aqueles que possuem o mesmo

distúrbio. Essa variação fenotípica deve-se a diferentes graus de deficiência enzimática, áreas do metabolismo envolvidas e tecidos afetados. No entanto, a manifestação clínica mais comum nos EIM deve-se ao acometimento do SNC, com retardo neuropsicomotor, crises encefalopáticas, neurodegeneração progressiva e outras alterações neurológicas (BURTON, 1987).

Os EIM foram classificados por Sinclair (1982), em quatro grupos, dependendo da função exercida pela enzima deficiente e do tecido envolvido, bem como dos aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos:

1) *Desordens de transporte*: afetam basicamente o transporte renal e/ou intestinal de moléculas orgânicas ou inorgânicas. Exemplos: deficiências de dissacaridases, defeito no transporte de magnésio e Doença de Hartnup.

2) *Desordens de armazenamento, degradação e secreção*: envolvem proteínas de organelas celulares como o aparelho de Golgi ou os lisossomas. Ocorre o acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos. Exemplos: doenças lisossômicas de depósito, glicogenoses e cistinose.

3) *Desordens de síntese*: deficiência na síntese de proteínas ou outras substâncias com funções importantes tais como hormônios, proteínas plasmáticas e de defesa imunológica. Exemplos: hiperplasia adrenal congênita por deficiência da enzima 21-hidroxilase da rota da síntese do cortisol.

4) *Desordens do metabolismo intermediário*: caracterizam-se por deficiências enzimáticas das rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo importantes rotas, como o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo da uréia, ou outras rotas. Assim, o substrato da enzima deficiente se acumula e, a menos que haja uma rota alternativa para metabolizá-lo, o produto final da reação não será formado. Os mecanismos de injúria podem ocorrer pela ação do substrato acumulado que pode ser tóxico, levando a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos por ser liberado na circulação e transportado para todo o organismo, por seus metabólitos ou pela falta de substâncias essenciais ao desenvolvimento do organismo, causada pelo bloqueio metabólico. Considerados os mais freqüentes EIM, essas desordens têm como exemplo as acidúrias orgânicas, as aminoacidopatias, as desordens do metabolismo das purinas e pentoses, e outros.

1.1.1 Acidemias Orgânicas

As acidemias ou acidúrias orgânicas são erros inatos do metabolismo nos quais, um ou mais ácidos orgânicos acumulam-se nos tecidos dos pacientes afetados devido à deficiência da atividade de uma enzima do metabolismo de aminoácidos, lipídeos ou carboidratos (CHALMERS e LAWSON, 1982). Vários ácidos orgânicos estão presentes no sangue e na urina de indivíduos normais, porém em concentrações reduzidas. Nos pacientes com estes distúrbios, estes ácidos encontram-se em altas concentrações no sangue e, principalmente, na urina.

Devido ao desconhecimento da classe médica, pela falta de laboratórios especializados e pela dificuldade de diagnóstico, a freqüência destas doenças na população em geral é pouco conhecida. Na Holanda, país considerado referência para o diagnóstico de erros inatos do metabolismo, a incidência destas doenças é estimada em 1: 2200 habitantes, enquanto que na Alemanha, Israel e Inglaterra é de aproximadamente 1:6000 – 1:9000 recém-nascidos (HOFFMANN *et al.*, 2004). Na Arábia Saudita, onde a taxa de consangüidade é elevada, a freqüência é de 1: 740 nascidos vivos (RASHED *et al.*, 1994).

No início da década de 80, foi demonstrado que estes distúrbios eram os erros inatos do metabolismo mais freqüentes em crianças gravemente enfermas (CHALMERS *et al.*, 1980), o que motivou maiores estudos clínico-laboratoriais e epidemiológicos nos anos que se seguiram.

Clinicamente os pacientes afetados apresentam, como sintomatologia mais comum, disfunção neurológica em suas diversas formas de expressão: regressão neurológica, convulsões, coma, ataxia, hipotonia, hipertonia, irritabilidade, tremores, movimentos coreatéticos, tetraparesia espástica, atraso no desenvolvimento psicomotor e outros. As mais freqüentes manifestações laboratoriais são cetose, cetonúria, neutropenia, trombocitopenia, acidose metabólica, baixos níveis de bicarbonato, hiperglicinemia, hiperglicinúria, hiperamonemia, hipo/hiperglicemia, acidemia láctica, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos livres, bem como cheiro peculiar na urina e/ou suor e outros (SCRIVER *et al.*, 2001). Com a utilização da tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear, foram verificadas freqüentemente alterações de substância branca (hipomielização e/ou desmielização), atrofia cerebral

generalizada ou de gânglios da base (necrose ou calcificação), megaencefalia, atrofia frontotemporal e atrofia cerebelar em pacientes afetados por estas doenças (MAYATEPEK *et al.*, 1996).

1.1.1.1 Acidemia Isovalérica

A acidemia isovalérica é um erro inato do metabolismo causado pela deficiência da atividade da enzima isovaleril-CoA desidrogenase (TANAKA *et al.*, 1966; SWEETMAN e WILLIAMS, 2001). Esta enzima é uma das presentes na rota catabólica da leucina (figura 1.1) e está localizada na mitocôndria (SCRIVER *et al.*, 2001). Foi o primeiro distúrbio do metabolismo de ácidos orgânicos diagnosticado por cromatografia gasosa (GC), sendo esta técnica no momento o melhor método analítico de ácidos orgânicos. Mais de 70 casos de acidemia isovalérica já foram relatados. A tecnologia da espectrometria em massa em Tandem (MS/MS ou Tandem MS) também tem se tornado útil para o diagnóstico da acidemia isovalérica pela detecção da elevação da isovalerilcarnitina (MILLINGTON *et al.*, 1990; ENSENAUER *et al.*, 2004; VOCKLEY e ENSENAUER, 2006; DIONISI-VICI *et al.*, 2006).

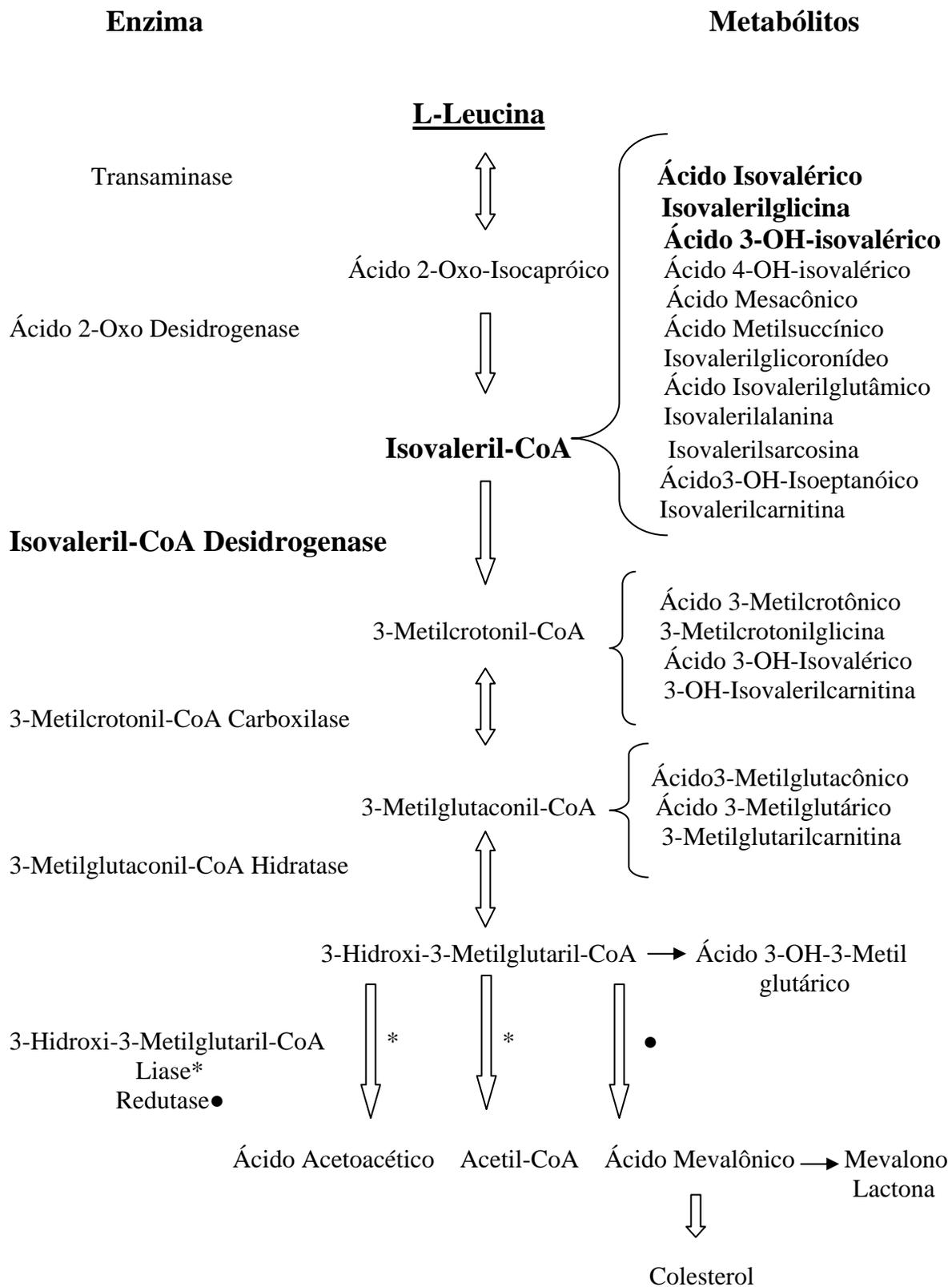


Figura 1.1 Catabolismo da Leucina (adaptado de Scriver *et al.*, 2001).

1.1.1.1.1 Aspectos Clínicos

Inicialmente, duas formas clínicas da acidemia isovalérica foram relatadas, com aproximadamente metade dos pacientes apresentando uma forma neonatal grave e aguda e a outra metade dos pacientes a forma intermitente e crônica. Recentemente, foi identificado um terceiro tipo de acidemia isovalérica com expressão fenotípica leve (ENSENAUER *et al.*, 2004). As três formas são devidas ao mesmo defeito bioquímico, a deficiência da atividade da desidrogenase da isovaleril-CoA (SCRIVER *et al.*, 2001).

Na forma aguda, 3 a 6 dias após o nascimento, as crianças começam a recusar o alimento, iniciam a vomitar, tornando-se desidratadas, desatentas e letárgicas. Podem também se apresentar hipotérmicas, com tremores e convulsões (COHN *et al.*, 1978). Um odor de pés suados devido à elevação da concentração de ácido isovalérico é descrito. Também ocorre acidose metabólica com leve a moderada cetonúria, acidemia láctica, hiperamonemia, trombocitopenia, neutropenia ou pancitopenia e hipocalcemia (FISCHER *et al.*, 1981). O progresso típico é que os pacientes se tornem cianóticos e entrem em coma seguido de morte. Mais da metade dos pacientes inicialmente relatados com a forma aguda não sobreviveram, mas com o rápido diagnóstico e os recentes melhoramentos na terapia, bem como com a administração de glicina e carnitina, o prognóstico desses pacientes tem sido muito mais favorável nos últimos anos (COHN *et al.*, 1978; FRIES *et al.*, 1996).

Na forma crônica, o quadro clínico é menos grave. O primeiro episódio da doença geralmente ocorre durante o primeiro ano de vida. Os episódios

subseqüentes da doença freqüentemente ocorrem após infecções respiratórias ou aumento da ingestão de alimentos ricos em proteínas. Eles tipicamente apresentam vômitos, letargia progredindo para o coma, acidose com cetonúria e o característico odor de pés suados (SHIH *et al.*, 1984). Nestas situações enfatize-se a necessidade de restrição de proteínas e infusão de glicose. Achados adicionais que podem ocorrer com os episódios incluem diarréia, trombocitopenia, neutropenia, pancitopenia, e em alguns casos alopecia e hiperglicemia; o último pode ser erroneamente confundido com cetoacidose diabética (ROE *et al.*, 1984; WILLIAMS *et al.*, 1981). Hiperglicemia pode ocorrer em várias acidemias orgânicas, incluindo a acidemia isovalérica. Alguns pacientes com a forma crônica intermitente da acidemia isovalérica tem desenvolvimento psicomotor normal, mas alguns têm o desenvolvimento atrasado e lento ou mesmo retardo mental grave (BUDD *et al.*, 1967; SHIH *et al.*, 1984). Muitos pacientes adquirem uma aversão natural por alimentos ricos em proteínas (GERDES *et al.*, 1988).

O terceiro variante menos comum é a forma intermediária causada por alterações leves na função da enzima isovaleril-CoA desidrogenase levando a um acúmulo dos metabólitos em concentrações menores do que nas outras duas formas. Além disso, os pacientes acometidos por essa forma de acidemia isovalérica são assintomáticos (MOHSEN *et al.*, 1998; NASSER *et al.*, 2004), sendo que a necessidade de terapia para esses pacientes ainda não está definida (VOCKLEY e ENSENAUER, 2006).

1.1.1.1.2 Metabólitos Acumulados

O nome acidemia isovalérica deriva de uma concentração elevada de ácido isovalérico encontrada no sangue dos pacientes (TANAKA *et al.*, 1966). A concentração normal de ácido isovalérico no plasma é menor do que 10 μM . Durante a remissão da doença os pacientes em tratamento podem ter concentração de ácido isovalérico normal, mas durante episódios severos os níveis alcançam até 100 a 500 vezes os níveis normais (600 a 5.000 μM). Além disso, a quantidade do ácido isovalérico na urina dos pacientes afetados é na ordem de 8 a 300 $\mu\text{mol}/\text{dia}$ (normal menos que 2 $\mu\text{mol}/\text{dia}$) (SCRIVER *et al.*, 2001).

O metabólito da isovaleril-CoA que mais se acumula e é excretado na urina devido à deficiência da atividade da isovaleril-CoA desidrogenase não é o seu produto da hidrólise, o ácido isovalérico, mas a isovalerilglicina, um composto amídico produzido pela conjugação com a glicina (TANAKA e ISSELBACHER, 1967). Essa reação é catalizada pela enzima mitocondrial glicina N-acilase, a qual também forma benzoilglicina (ácido hipúrico) a partir de benzoil-CoA (BARTLETT e GOMPertz, 1974; GREGERSEN *et al.*, 1986). A excreção urinária de isovalerilglicina por pacientes com acidemia isovalérica varia de 2.000 a 15.000 $\mu\text{mol}/\text{dia}$, comparado com excreções normais de menos do que 15 $\mu\text{mol}/\text{dia}$. A excreção é maior durante episódios agudos, mas é ainda muito alta durante a remissão. Durante episódios agudos, quando a quantidade de isovaleril CoA esta muito aumentada, a capacidade da glicina N-acilase é excedida, e o ácido isovalérico livre se torna elevado. Um segundo metabólito do ácido isovalérico que

foi identificado é o ácido 3-hidroxi-isovalérico (TANAKA *et al.*, 1968). Ele é excretado em quantidades anormais somente durante episódios agudos, podendo ter valores tão altos quanto 3.000 $\mu\text{mol}/\text{dia}$. A isovaleril-CoA pode formar também isovalerilcarnitina. No plasma ou em sangue em papel de filtro, a isovalerilcarnitina elevada é importante para o diagnóstico da doença (SCRIVER *et al.*, 2001).

1.1.1.1.3 Deficiência da Enzima e Genética

A oxidação do ácido isovalérico para CO_2 em leucócitos e a oxidação da leucina para CO_2 em fibroblastos é deficiente em pacientes com acidemia isovalérica (TANAKA *et al.*, 1966; SHIH *et al.*, 1973; TANAKA *et al.*, 1976; MOHSEN *et al.*, 1998), o que pode ser explicado pela deficiência da enzima isovaleril-CoA desidrogenase. Uma técnica sensível para medir a atividade da isovaleril-CoA desidrogenase é baseada na liberação de trício da isovaleril-CoA marcada (RHEAD *et al.*, 1981), revelando uma atividade da enzima em mitocôndrias isoladas de fibroblastos de pacientes com acidemia isovalérica da ordem 0 a 3,5% do normal (HYMAN e TANAKA., 1986).

A acidemia isovalérica é uma doença autossômica recessiva. O gene da isovaleril-CoA desidrogenase está localizado no cromossomo humano 15q14-q15. A apresentação aguda neonatal e a forma intermitente crônica podem ocorrer na mesma família, sugerindo que a heterogeneidade clínica é causada por fatores não genéticos (SCRIVER *et al.*, 2001).

A realização de estudos genéticos complementares indica que os pacientes afetados com a doença apresentam envolvimento de um único locus. A

heterogeneidade molecular da isovaleril-CoA desidrogenase foi demonstrada em fibroblastos de 15 pacientes com acidemia isovalérica, sendo oito mutações diferentes encontradas (DUBIEL *et al.*, 1983; ENSENAUER *et al.*, 2004; VOCKLEY e ENSENAUER, 2006).

1.1.1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da acidemia isovalérica requer análise de ácidos orgânicos na urina, visto que as manifestações clínicas são comuns para várias acidúrias orgânicas, incluindo a isovalérica. Um odor de pés suados durante os episódios agudos pode ser sugestivo de acidemia isovalérica, mas deve ser distinguido de um odor similar que pode ocorrer na aciduria glutárica tipo 2 devido a acumulação dos ácidos isobutírico, 2-metilbutírico e isovalérico. A possibilidade da acidemia isovalérica deve ser considerada em recém nascidos ou em crianças com uma combinação de recusa alimentar, vômitos, letargia, coma, acidose metabólica, cetose, hiperamonemia, hipocalcemia, neutropenia, trombocitopenia, e pancitopenia. A análise de ácidos orgânicos voláteis de cadeia curta no plasma mostra elevação do ácido isovalérico sem elevação dos outros ácidos de cadeia curta, sugerindo o diagnóstico de acidemia isovalérica. No entanto, análises exatas dos ácidos orgânicos de cadeia curta no plasma são difíceis e com frequência não estão prontamente disponíveis. Assim, prefere-se a análise de ácidos orgânicos em geral que mostram elevações da isovalerilglicina e do ácido 3-hidroxi-isovalérico (TANAKA *et al.*, 1980). Além disso, também se encontram grandes elevações não específicas de lactato, bem como dos ácidos 3-

hidroxibutírico e acetoacético. Durante a remissão, o único metabólito comumente observado é a isovalerilglicina (1000 a 3000 mmol/mol de creatinina).

A análise dos ésteres de carnitina no sangue e urina é complementar à análise de ácidos orgânicos para o diagnóstico da acidemia isovalérica. As acil-CoAs estão em equilíbrio com as suas acilcarnitinas, sendo as últimas presentes no plasma e prontamente excretadas na urina. A isovalerilcarnitina, portanto, em pequenas concentrações (10 a 20 mmol/mol de creatinina) é identificada por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) na urina de pacientes com acidemia isovalérica mesmo durante a remissão. A administração oral de 100mg/kg de L-carnitina aumenta a excreção de isovalerilcarnitina até aproximadamente 3200 mmol/mol de creatinina, sugerindo que a administração de carnitina aumentaria a confiabilidade do diagnóstico da acidemia isovalérica por detecção de acilcarnitinas na urina. O diagnóstico da acidemia isovalérica por detecção dos metabólitos anormais pode ser confirmado pela deficiência severa da atividade da isovaleril-CoA desidrogenase em fibroblastos pela liberação de trítio (HYMAN e TANAKA, 1986; LOOTS *et al.*, 2005).

O diagnóstico pré-natal da acidemia isovalérica pode ser feito pela detecção da atividade da isovaleril-CoA desidrogenase em cultura de amniócitos ou pela detecção de concentrações elevadas do ácido isovalérico e da isovalerilglicina no líquido amniótico após amniocentese (HINE *et al.*, 1986; SHIGEMATSU *et al.*, 1991). Assim, a isovalerilglicina é quase que indetectável nos fluidos amnióticos normais, contudo, mulheres que tiveram fetos afetados com acidemia isovalérica, este composto aparece altamente elevado (3,50 a 6,02 μ M). Portanto a

quantificação deste composto no líquido amniótico propicia um rápido e preciso diagnóstico de acidemia isovalérica.

1.1.1.1.5 Tratamento

O tratamento de pacientes afetados por acidemia isovalérica durante os episódios agudos é praticamente o mesmo dos afetados por outras acidurias orgânicas e consta fundamentalmente de hidratação, infusão de glicose para prover calorias e reduzir o catabolismo protéico endógeno e infusão de bicarbonato de sódio para controlar a acidose (TANAKA e ROSEMBERG, 1983; TANAKA, 1986; VOCKLEY e ENSENAUER, 2006). O tratamento durante a recuperação e remissão geralmente consiste na restrição dietética de uma dieta natural protéica (1,5 g/Kg de proteína por dia), bem como de leucina que é precursora do ácido isovalérico. Este tratamento tem sido efetivo na diminuição da freqüência dos episódios de descompensação metabólica.

Por outro lado, a concentração de glicina no plasma de pacientes com acidemia isovalérica tende a diminuir durante episódios agudos, sugerindo que quantias insuficientes de glicina estão disponíveis para a síntese da isovalerilglicina (KRIEGER e TANAKA, 1976). Assim, o aumento da concentração de glicina plasmática através da ingestão de glicina (250 mg/Kg por dia de glicina dividida em 3 doses) é aconselhável no tratamento a longo prazo desses pacientes, o que provocaria um aumento da razão isovaleril-glicina/ ácido isovalérico por aumento da concentração de isovalerilglicina. Quando a glicina foi administrada oralmente com um competidor da leucina para um paciente com

acidemia isovalérica, o usual aumento do ácido isovalérico no plasma foi prevenido e a excreção de isovalerilglicina dobrada (DE SOUZA *et al.*, 1986; ELSAS e NAGLAK, 1988).

Além disso, vários pacientes com acidemia isovalérica apresentam uma deficiência de carnitina total e uma grande percentagem de carnitina esterificada no plasma e na urina (MAYATEPEK *et al.*, 1991; ROE *et al.*, 1984), sendo aconselhável tratá-los rotineiramente com L-carnitina (100 mg/Kg por dia dividida em duas doses) (LEE *et al.*, 1998). Embora seja difícil determinar se a glicina ou a carnitina é mais efetiva ao tratamento a longo prazo da acidemia isovalérica, os dois medicamentos provocaram uma redução do ácido isovalérico e da isovalerilglicina nos líquidos biológicos.

1.1.1.1.6 Fisiopatologia

Pouco se sabe sobre a fisiopatogenia do dano cerebral que ocorre nos pacientes afetados por acidemia isovalérica. Neste contexto, resultados recentes demonstraram em córtex cerebral de ratos que o IVA, metabólito predominantemente acumulado na acidemia isovalérica, inibe a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase envolvida na manutenção do potencial de membrana basal necessária para uma neurotransmissão normal. Considerando que a inibição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase causada pelo IVA foi completamente prevenida pela adição de trolox (vitamina E hidrossolúvel), foi sugerido que esse efeito deveu-se, ao menos em parte, à indução de peroxidação lipídica da membrana

plasmática sináptica, onde a enzima está ancorada (RIBEIRO *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que o ácido 3-hidroxiisovalérico, que se acumula na acidemia isovalérica, bem como nas acidemias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica, induz a produção de espécies ativas (LEIPNITZ *et al.*, 2008 a,b). Caso esses resultados *in vitro* forem confirmados em estudos *in vivo* e em pacientes portadores da doença, é possível que a inibição dessa enzima possa contribuir, ao menos em parte para a encefalopatia encontrada na acidemia isovalérica, especialmente durante as crises de descompensação metabólica em que os metabólitos tóxicos acumulados aumentam dramaticamente suas concentrações teciduais.

1. 2 Radicais Livres

1.2.1 Definição

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (SOUTHORN e POWIS, 1988; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007c). O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a essas espécies. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron de um não-radical ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Radicais podem também ser formados em um processo de fissão homolítica, no qual uma ligação covalente é quebrada e cada elétron do par compartilhado permanece com cada um dos átomos envolvidos

(HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Quando um radical livre reage com um composto não-radical, outro radical livre pode ser formado. Assim, a presença de um único radical pode iniciar uma seqüência de reações em cadeia de transferência de elétrons (redox) (MAXWELL, 1995). Nas reações em cadeia induzidas pelos radicais livres, um radical reativo leva à formação de um produto que também é um radical livre e que, por sua vez, reage produzindo um terceiro radical.

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2) sofre redução tetravalente, com recebimento de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não é completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (OH^{\bullet}), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (BOVERIS e CHANCE, 1973).

O termo genérico espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 ($O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet}), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* (1O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) as principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas apresentam diversas

funções (BERGENDI *et al.*, 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (DELANTY e DICHTER, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD e PETERS, 1995).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas tem o potencial de oxidar moléculas (MAXWELL, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e conseqüente alteração de sua função e reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e a distúrbios de transcrição (DELANTY e DICHTER, 1998), entre outros efeitos.

1. 3 Lipoperoxidação

Antes de ser vista como um mecanismo de dano oxidativo, a lipoperoxidação deve ser considerada como um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um fator de renovação da membrana, este processo é essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. No entanto, por serem formadas em grande parte por lipídios insaturados e proteínas, as membranas são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Assim, quando a produção de espécies reativas aumenta acima da capacidade de detoxificação, a

lipoperoxidação acelerada acarretará profundas alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Isso irá causar perda de seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenal, entre outros eventos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997, BECKMAN e AMES, 1998).

A lipoperoxidação possui etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação é causada pelo ataque a um lipídio de membrana por parte de qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). Nesse contexto, radicais hidroxila podem prontamente iniciar a lipoperoxidação. Já que o átomo de hidrogênio tem apenas um elétron, a retirada de H^\bullet de um grupo metileno deixa um elétron desemparelhado no carbono ($-\text{C}^\bullet\text{H}-$). Esse radical formado é geralmente estabilizado por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. O destino mais provável desse radical é reagir com o O_2 , formando um radical peroxila (LOO^\bullet). Os radicais peroxila, por sua vez, são capazes de subtrair um hidrogênio de outra molécula lipídica, sendo esta fase conhecida como a fase de propagação. O radical de carbono formado pode reagir com o O_2 para formar outro radical peroxila, e assim sucessivamente. A retirada de um hidrogênio de outro lipídio por parte do radical peroxila gerará um hidroperóxido lipídico (LOOH). O término da reação poderá ocorrer quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formando um produto estável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c; HALLIWELL, 2006).

1. 4 Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua detoxificação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo e compreendem:

- * agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras;

- * proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas;

- * proteínas que protegem biomoléculas de danos (incluindo dano oxidativo) por outros mecanismos;

- * agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

1. 5 Estresse Oxidativo

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

* *Adaptação*: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em *up-regulation* da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.

* *Dano celular*: o estresse oxidativo pode danificar alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em *steady state* alterado temporário ou prolongado que não leva à morte celular.

* *Morte celular*: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a glutathione, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo HEME, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo impor a elas um estresse oxidativo. Já na apoptose o mecanismo intrínseco de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode ser acelerada em certas doenças, como as

desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

Além da indução de necrose e apoptose, o estresse oxidativo pode levar a aumento da lipoperoxidação, cujos produtos malondialdeído e 4-hidroxinonenal, entre outros são altamente neurotóxicos, bem como a dano oxidativo tanto a proteínas, inibindo a atividade de diversas enzimas e alterando a função celular e ao DNA, causando alteração de bases púricas e pirimídicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c).

1. 6 Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para explicar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, ou, possivelmente, um somatório desses fatores (ROSE e HENNEBERRY, 1994).

O cérebro é altamente dependente de energia para o seu funcionamento normal e a mitocôndria é a estrutura intracelular responsável pela produção dessa energia. Para a produção eficiente de energia na forma de ATP, a mitocôndria possui uma alta demanda por oxigênio, já que utiliza uma grande quantidade de O₂ em uma massa de tecido relativamente pequena, o que o torna altamente susceptível à ação de espécies reativas. Outros fatores também contribuem para

essa susceptibilidade como o alto conteúdo de ferro presente no cérebro, que pode favorecer a lipoperoxidação; o seu alto conteúdo lipídico, principalmente lipídios de cadeia lateral poliinsaturada que são extremamente susceptíveis à lipoperoxidação; e à sua modesta defesa antioxidante, sendo os níveis de catalase particularmente baixos em muitas regiões cerebrais (HALLIWELL, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007c). Além disso, uma disfunção mitocondrial pode ocorrer por diminuição da atividade dos complexos da cadeia respiratória com um conseqüente prejuízo no transporte de elétrons, o que leva a uma dispersão dos elétrons na forma de radicais livres potencialmente danosos à célula.

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese do dano neurológico em várias doenças neurodegenerativas. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson. Essa inibição do complexo I pode acarretar a geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, radicais hidroxila e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formem um ciclo vicioso na doença de Parkinson (GU *et al.*, 1996; JANETSKY *et al.*, 1994; SCHAPIRA *et al.*, 1989, 1990 a, b).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Têm sido proposto que o peptídeo β -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres

espontaneamente. Estudos *in vivo* também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (SMITH *et al.*, 1991; MARKESBERY e CARNEY, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al.*, 1999; LOVELL *et al.*, 2000).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (MARK, 1999; ALEXI *et al.*, 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de Parkinson e Alzheimer. Recentemente foi verificado que o ácido isovalérico que se acumula em grandes concentrações nos tecidos dos pacientes com acidemia isovalérica inibe a enzima Na^+ , K^+ -ATPase provavelmente por indução de radicais livres (RIBEIRO *et al.*, 2007), sugerindo que este composto possa causar dano oxidativo.

Considerando a importância dos radicais livres e do estresse oxidativo como mecanismo fisiopatogênico de doenças neurodegenerativas, surgiram diversas drogas para a terapia de pacientes portadores dessas doenças baseadas em um mecanismo antioxidante, tais como seqüestradores de ânion superóxido, análogos da vitamina E, inibidores da peroxidação lipídica, inibidores da enzima óxido nítrico sintase, entre outras.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho objetiva investigar o efeito *in vitro* do ácido isovalérico e da isovalerilglicina que se acumulam na acidemia isovalérica sobre parâmetros de estresse oxidativo em homogeneizado de córtex cerebral de ratos, visando contribuir para uma melhor compreensão da fisiopatogenia do dano neurológico presente nessa doença.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito *in vitro* do ácido isovalérico e da isovalerilglicina sobre os parâmetros de peroxidação lipídica (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico: TBA-RS e quimiluminescência) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- b) Avaliar o efeito *in vitro* do ácido isovalérico e da isovalerilglicina sobre as defesas antioxidantes não enzimáticas potencial antioxidante total (TRAP) reatividade antioxidante total (TAR) e as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;
- c) Avaliar o efeito *in vitro* do ácido isovalérico e da isovalerilglicina sobre a oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (produção de espécies reativas) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;

d) Avaliar o efeito *in vitro* do ácido da isovalérico e isovalerilglicina sobre parâmetros de dano protéico (formação de carbonilas e oxidação de sulfidrilas) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA).

Os metabólitos ácido isovalérico (IVA), isovalerilglicina (IVG) e glicina (GLI) foram sempre dissolvidos e diluídos em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, no dia da realização dos ensaios.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos do Biotério do Departamento de Bioquímica do ICBS, UFRGS. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração comercial (Supra, POA, RS, Brasil) contendo 20,5% proteína (predominantemente de soja), 54% de carboidratos, 4% de lipídios, 4,5% de fibras, 7% cinzas e 10% de umidade. Eles foram mantidos em ciclo claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

3.3 Preparação das amostras e incubação

Ratos machos Wistar de 30 dias de idade foram utilizados em todas as técnicas. Os ratos foram sacrificados, sem anestesia, por decapitação, o cérebro foi removido e o córtex dissecado. A seguir, o córtex cerebral foi homogeneizado em tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, na proporção de 1:10 (P/V) e o homogeneizado obtido foi levado à centrifugação a 650 g durante 10 min a 4°C . O sobrenadante obtido foi separado.

Finalmente, alíquotas foram retiradas e usadas imediatamente para a realização de uma pré-incubação de 1 hora na ausência dos metabólitos (grupo controle) ou presença dos mesmos (grupos teste), IVA (0,01-10mM), IVG (0,01-1mM) e GLI (0,1-5mM).

3.4 Parâmetros de estresse oxidativo

3.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

A medida de níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) foi realizada de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). 300 µL de ácido tricloroacético 10 % foram adicionados à alíquota retirada da incubação previamente realizada. Após centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1, 1, 3, 3 – tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Em alguns ensaios, foi feita uma co-incubação dos homogeneizados com a IVG e com os antioxidantes trolox (TRO, 1,5 µM), melatonina (MEL, 200 µM), glutathiona (GSH, 100 µM), N^ω-nitro-L-arginina (LNAME, 500 µM), N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), combinação de catalase (CAT, 2,5 mU/mL) e superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) ou creatina (Cr, 3,0 mM) ou então com doses maiores dos antioxidantes MEL (1 mM), TRO (10 µM), combinação de SOD (15 mU/mL) e CAT (15 mU/mL) ou GSH (750 µM) (LEIPNITZ

et al., 2008 a,b). Os resultados foram calculados como nmol TBA-RS / mg de proteína e expressos como percentagem do controle.

3.4.2 Quimiluminescência

A medida da quimiluminescência foi realizada através do método de González-Flecha *et al.* (1991). Aos tubos foram adicionados 3,5 mL de tampão contendo fosfato de sódio 20 mM e cloreto de potássio 140 mM, pH 7,4, e a luminescência basal foi medida em contador de cintilação líquida durante 5 min. Após essa leitura, uma alíquota de 500 μ L das amostras incubadas foi imediatamente adicionada e a quimiluminescência foi medida durante 30 min a temperatura ambiente. Todo o procedimento foi realizado em sala escura e à temperatura ambiente. Os tubos utilizados para esta técnica foram lavados separadamente de outros materiais do laboratório com solução detergente, exaustivamente enxaguados com água destilada, fervidos por 10 minutos e mantidos no escuro 12 horas antes do experimento. O valor total foi diminuído do valor basal e os resultados foram calculados como cpm / mg proteína e expressos como percentagem do controle.

3.4.3 Glutathiona reduzida (GSH)

As concentrações de glutathiona reduzida (GSH) foram medidas de acordo com a técnica de Browne e Armstrong (1998). As alíquotas provenientes da pré-incubação foram tratadas com ácido metafosfórico com o objetivo de precipitar as proteínas e proporcionar um meio com pH ácido para a glutathiona ser mantida na

forma reduzida. Após centrifugação, foram adicionados 50 μ L de o-ftaldialdeído a 100 μ L do sobrenadante obtido. A fluorescência gerada foi medida com comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 420 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com GSH padrão (0,01-1 mM), a concentração calculada em pmol GSH / mg proteína e expressa como porcentagem do controle.

3.4.4 Potencial antioxidante total (TRAP)

Representa a capacidade antioxidante total do tecido, sendo determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pela adição de 2,2'-azo-bis-(2-aminopropano) (ABAP) à temperatura ambiente (LISSI, PASCUAL *et al.*, 1992, 1995; EVELSON *et al.*, 2001). O TRAP traduz, assim, a capacidade do tecido em resistir ao estresse oxidativo pela adição de uma fonte de radicais livres (ABAP) ao sistema. A quimiluminescência inicial foi obtida pela adição de 3 mL de ABAP 10 mM, dissolvidos em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4, e 10 μ L de luminol (5,6 mM) em um frasco de cintilação. Foram então acrescentados 10 μ L de Trolox 160 μ M (Vitamina E hidrossolúvel) ou de sobrenadante de amostra, e a quimiluminescência foi medida até atingir os valores iniciais. O tempo necessário para que a quimiluminescência volte aos valores iniciais é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido. O potencial antioxidante das amostras foi calculado em relação ao potencial antioxidante medido do trolox, sendo os resultados calculados em nmol de Trolox/mg de proteína e expressos como porcentagem do controle.

3.4.5 Reatividade antioxidante total (TAR)

A medida da reatividade antioxidante total (TAR) indica a qualidade dos antioxidantes de um determinado tecido ou órgão. A TAR é determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pelo 2, 2'-azo-bis-(2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente (LISSI *et al.*, 1992, 1995). Para a preparação das soluções de uso (ABAP 10 mM, luminol 4 mM e Trolox 80 μ M) foi utilizado tampão glicina 0,1 M, pH 8,6. A solução de ABAP foi utilizada como formadora de radicais livres, a de luminol como amplificadora do sinal de quimiluminescência e a de Trolox (vitamina E hidrossolúvel) como padrão antioxidante. Inicialmente, a quimiluminescência basal foi medida em cintilador através da adição de 4 mL de ABAP 2,0 mM em um tubo no escuro. 10 μ L de luminol foram então adicionados ao tubo e a quimiluminescência foi medida. Este foi considerado o valor inicial. A seguir, adicionou-se 10 μ L de Trolox 10-100 μ M (curva de calibração) ou a amostra, e a quimiluminescência foi medida durante 60 segundos. O Trolox ou a amostra reduz a quimiluminescência inicial e essa rápida redução na intensidade gerada pelo luminol é considerada uma medida da TAR. A medida da TAR foi calculada como nmol de Trolox / mg de proteína e expressa como percentagem do controle.

3.4.6 Oxidação do diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA)

A produção de espécies reativas foi determinada de acordo com o método de LeBel *et al.* (1992) utilizando o diacetato de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Às alíquotas provenientes da pré-incubação, adicionou-se a forma diacetato

do DCF que é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram então incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCFH-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente DCF. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 e 535 nm, respectivamente. A curva de calibração foi realizada com DCF padrão (0-10 µM) e a concentração das espécies reativas foi calculada em pmol de DCF formado / mg proteína e expressa em percentagem do controle.

3.4.7 Formação de carbonilas

A medida de formação de carbonilas foi realizada espectrofotometricamente de acordo com Reznick e Packer (1994). Uma alíquota de 100 µL da incubação foi tratada com 400 µL de uma solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) 10 mM preparada em HCl 2,5 N ou com HCl 2,5 N (branco) e deixada 1 hora no escuro à temperatura ambiente. As amostras foram então precipitadas com TCA 20 % e centrifugadas durante 5 min a 9000 g. Após a centrifugação, o pellet obtido foi lavado 2 vezes com uma mistura de etanol:acetato de etila (1:1, V/V) e ressuspenso em 550 µL de guanidina 6 M. A diferença entre as amostras tratadas com DNFH e as tratadas com HCl (branco) foi utilizada para calcular o conteúdo de carbonilas da amostra a 365 nm. Os resultados foram calculados como nmol carbonilas / mg de proteína utilizando-se o coeficiente de extinção de 22.000×10^6 nmol / mL para hidrazonas alifáticas e expressos como percentagem do controle.

3.4.8 Tióis totais

A medida de sulfidrilas totais, foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A alíquotas de 50 μ L da incubação foi adicionado o reagente ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico) (DTNB). O DTNB é um reagente que, ao ser reduzido pelos grupamentos tióis presentes na amostra, gera um derivado de cor amarela (TNB) que é lido em espectrofotômetro a 412 nm. Os resultados foram calculados como nmol de TNB/mg de proteína e expressos como percentagem do controle.

3.5 Medida de proteínas

O conteúdo protéico em todas as técnicas empregadas foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951), usando albumina sérica bovina como padrão.

3.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e a média usada para os cálculos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de Duncan, quando o F foi significativo. O teste de regressão linear foi também utilizado para se verificar efeitos de dose-resposta. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Toda a análise estatística foi feita através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) em um computador PC compatível.

4 RESULTADOS

Inicialmente estudamos o efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA 0,01-10mM) e da isovalerilglicina (IVG 0,01-1mM) sobre os parâmetros de peroxidação lipídica: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e quimiluminescência em sobrenadantes de córtex cerebral de ratos jovens.

4.1 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.1 mostra que o IVA, em concentrações tão altas quanto 10 mM, não alterou significativamente os níveis de TBA-RS em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [$F_{(5,30)} = 1,027$; $P = 0,420$]. Por outro lado, a IVG aumentou significativamente (35-40%) os níveis de TBA-RS a partir da concentração de 0,5 mM [Figura 4.2.: $F_{(5,26)} = 10,735$; $P < 0,001$] de forma dose dependente [$\beta = 0,800$; $P < 0,001$]. Resolvemos testar o efeito da glicina (GLI) sobre este mesmo parâmetro para verificar se este aminoácido que faz parte da molécula da isovalerilglicina poderia ser capaz de alterar este parâmetro. Observamos na Figura 4.3 que a GLI a partir de 2.5 mM aumentou (25%) os níveis de TBA-RS [$F_{(4,15)} = 12,88$; $P < 0,001$] de forma dose dependente [$\beta = 0,856$; $P < 0,001$].

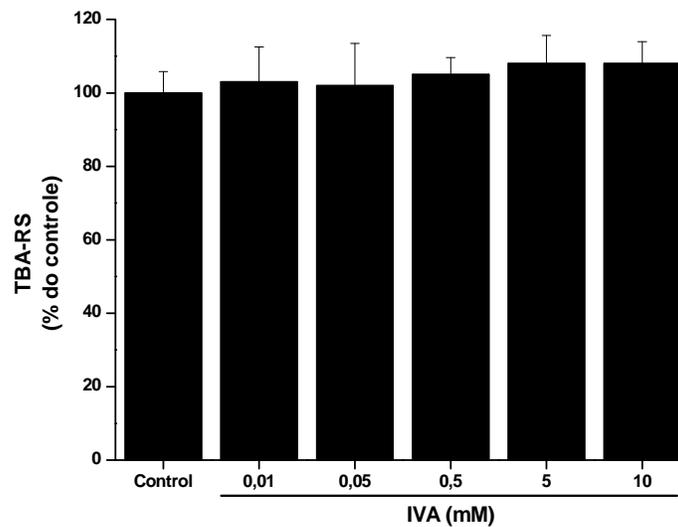


Figura 4.1 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=6) e estão expressos em porcentagem do controle (Controle: $4,48 \pm 0,25$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

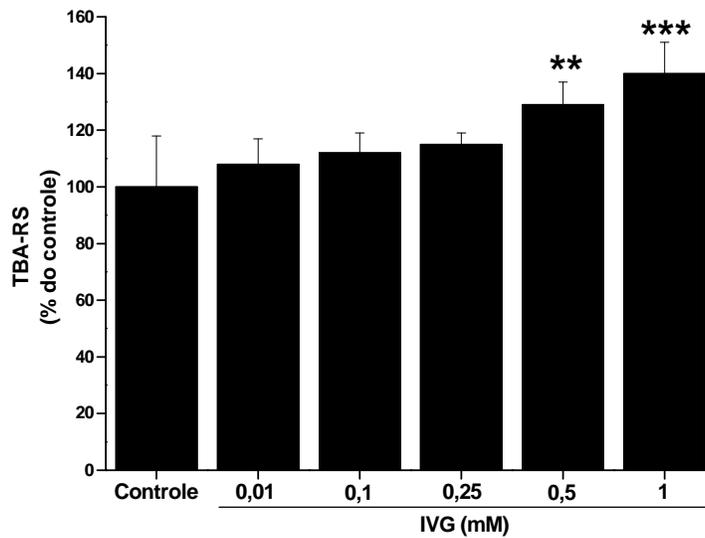


Figura 4.2 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-8) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $3,72 \pm 0,66$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

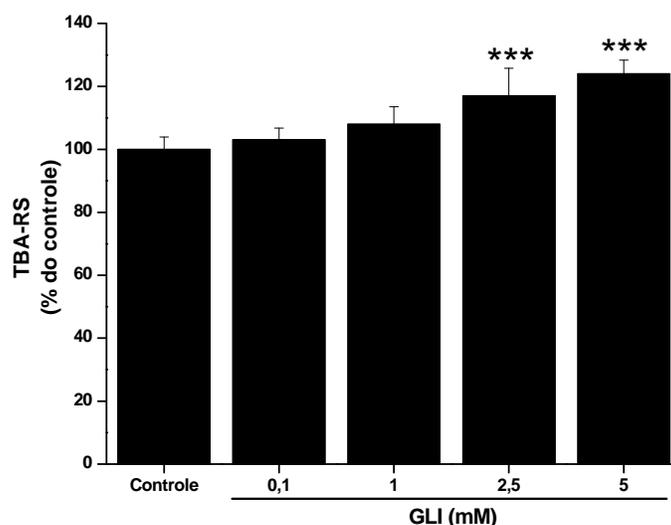


Figura 4.3 – Efeito *in vitro* da glicina (GLI) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $4,48 \pm 0,25$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $P < 0,001$, comparado ao controle).

4.2. Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.4 mostra que o IVA, em concentrações tão altas quanto 10 mM, não alterou significativamente a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral de ratos [$F_{(3,18)} = 0,379$; $P > 0,05$]. Por outro lado, podemos observar na Figura 4.5 que a IVG, na concentração de 1 mM, aumentou significativamente

(30%) a quimiluminescência ($F_{(3,16)}=5,109$; $P < 0,01$). Além disso, a Figura 4.6 mostra que a GLI, na concentração de 5 mM, também aumentou significativamente (23%) a quimiluminescência em homogeneizado de córtex cerebral [$F_{(3,12)}=4,503$; $P < 0,05$].

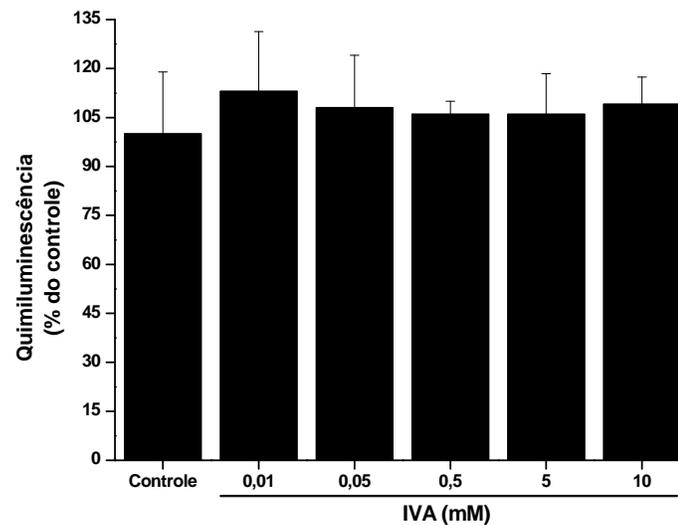


Figura 4.4 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: 3326 ± 627 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

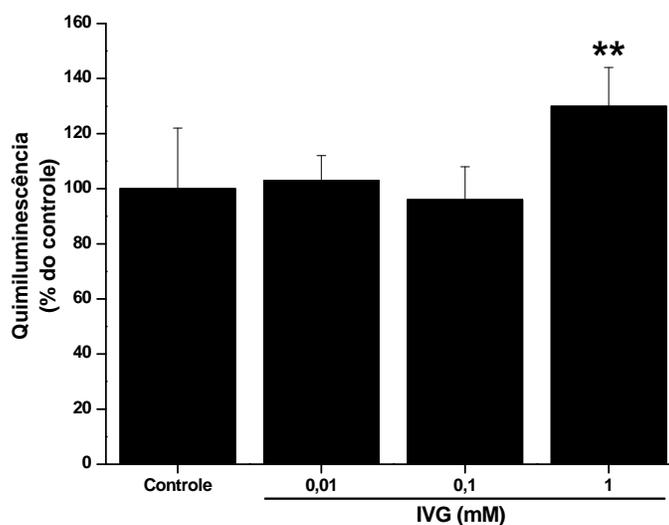


Figura 4.5 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e foram expressos em percentual do controle (Controle: 3318 ± 764 cpm / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P < 0,01$, comparado ao controle).

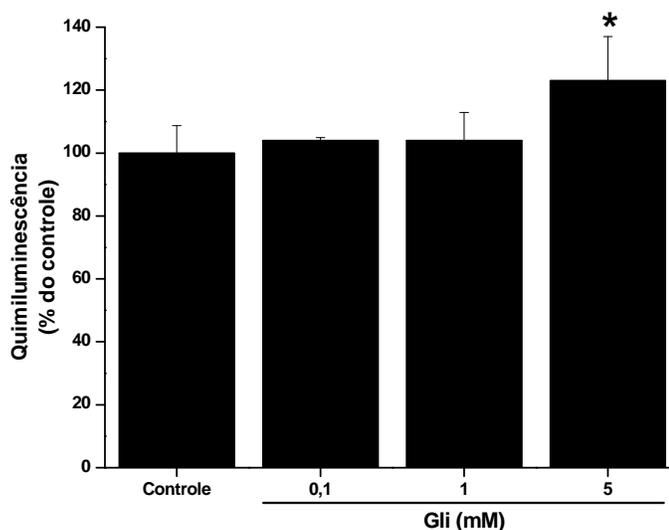


Figura 4.6 – Efeito *in vitro* da glicina (GLI) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e foram expressos em percentual do controle (Controle: 2154 \pm 187 cpm/ mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* P <0,05, comparado ao controle).

A seguir, com o objetivo de elucidar as espécies reativas envolvidas na indução de peroxidação lipídica causada pela IVG, testamos o efeito desse metabólito sobre os níveis de TBA-RS na presença ou ausência de antioxidantes em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.3 Efeito de antioxidantes sobre o aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Inicialmente, testamos o efeito dos antioxidantes trolox (TRO, 1,5 μ M), melatonina (MEL, 200 μ M), glutathione (GSH, 100 μ M), N^ω-nitro-L-arginina (LNAME, 500 μ M), N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), combinação de catalase (CAT, 2,5 mU/mL) e superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) e creatina (Cr, 3,0 mM) sobre a indução de peroxidação lipídica por 1 mM de IVG (Figuras 4.7 a 4.13). As concentrações dos antioxidantes utilizadas foram as descritas na literatura usualmente capazes de reverter efeitos oxidantes (LEIPNITZ *et al.*, 2008 a,b). Verificamos que apenas a NAC foi capaz de prevenir o aumento de TBA-RS causado pelo metabólito IVG [Figura 4.11: $F_{(3,12)}=15,310$; $P<0,001$]. A seguir testamos o efeito de doses maiores dos antioxidantes MEL, TRO, GSH e a combinação de CAT e SOD sobre o aumento dos níveis de TBA-RS causado pela IVG (Figura 4.14). Verificamos que os antioxidantes MEL, TRO e GSH, em concentrações maiores, foram capazes de prevenir o efeito causado pela IVG [$F_{(5,26)}=17,136$; $P<0,001$].

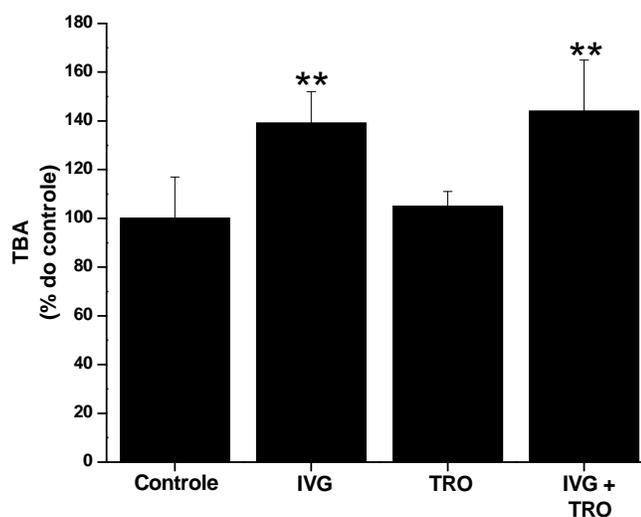


Figura 4.7 – Efeito do trolox (α -tocoferol hidrossolúvel; TRO, 1,5 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: 2,61 \pm 0,45 nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** P <0,01, comparado ao controle).

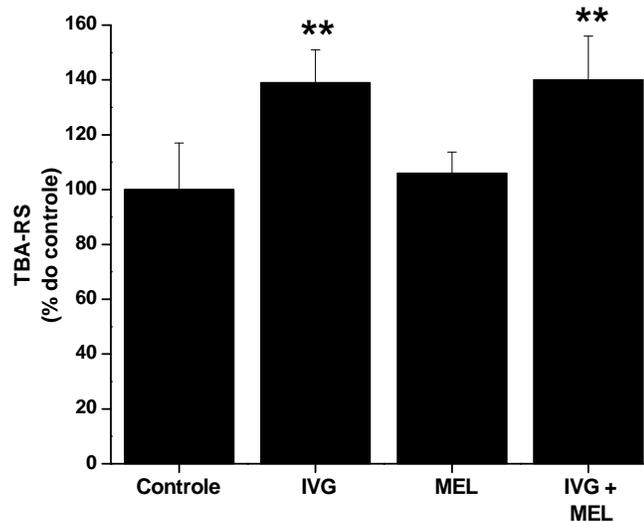


Figura 4.8 – Efeito da melatonina (MEL, 200 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: 2,61 \pm 0,45 nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** P <0,01, comparado ao controle).

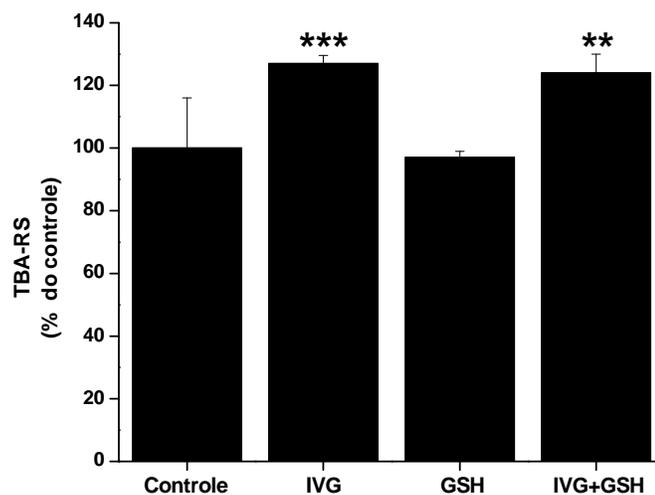


Figura 4.9 – Efeito da glutathiona (GSH, 100 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-6) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $3,67 \pm 0,62$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

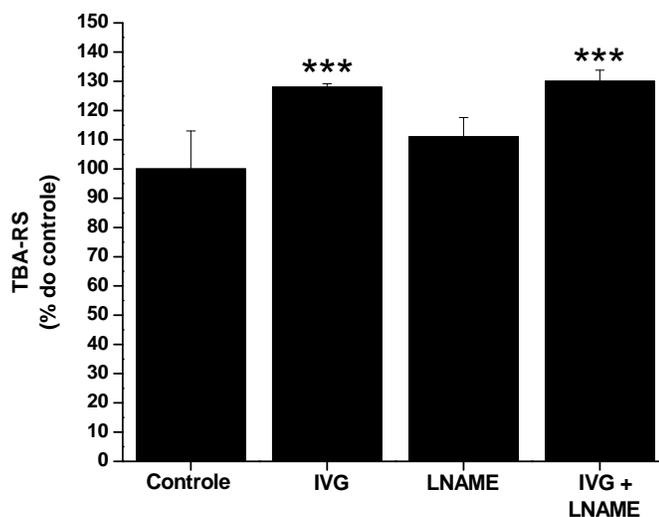


Figura 4.10 – Efeito da N^ω-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME, 500 μM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média ± desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: 2,61 ± 0,45 nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $P < 0,001$, comparado ao controle).

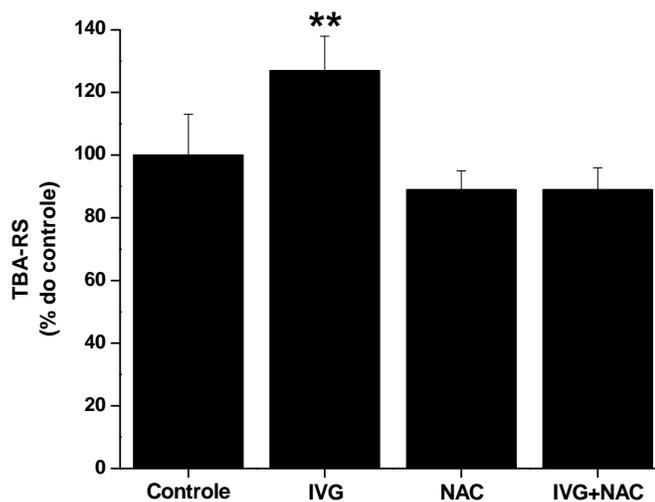


Figura 4.11 – Efeito da N-acetilcisteína (NAC, 1 mM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $3,68 \pm 0,48$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P < 0,01$, comparado ao controle).

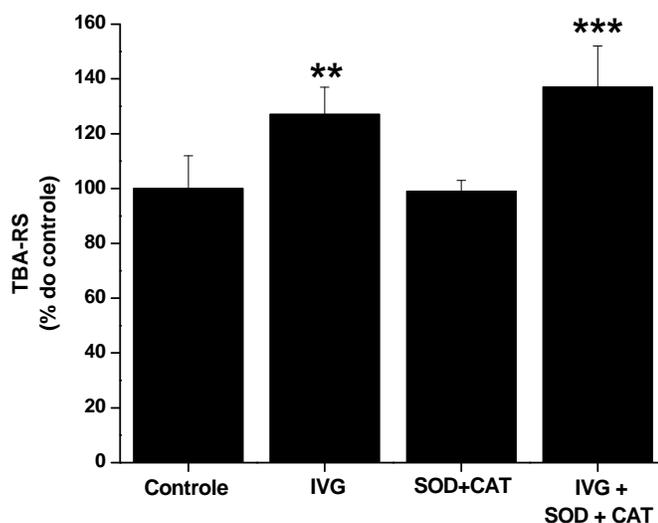


Figura 4.12 – Efeito da combinação das enzimas superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) e da catalase (CAT, 2,5 mU/mL) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4-7$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $3,18 \pm 0,4$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P<0,01$, *** $P<0,001$, comparado ao controle).

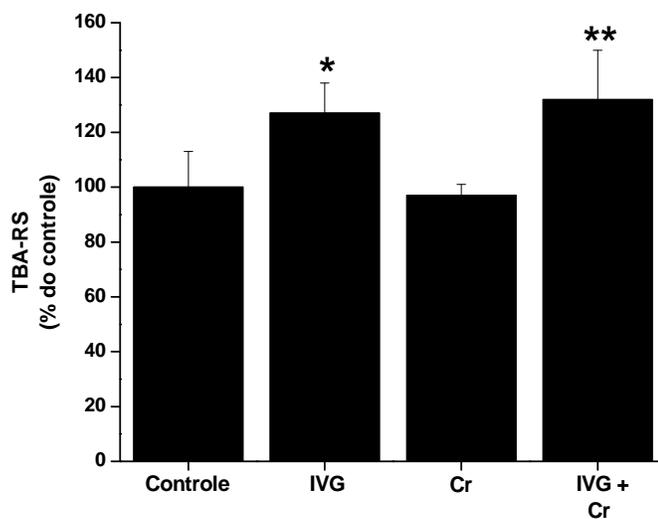


Figura 4.13 – Efeito da creatina (Cr, 3 mM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $3,18 \pm 0,4$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, comparado ao controle).

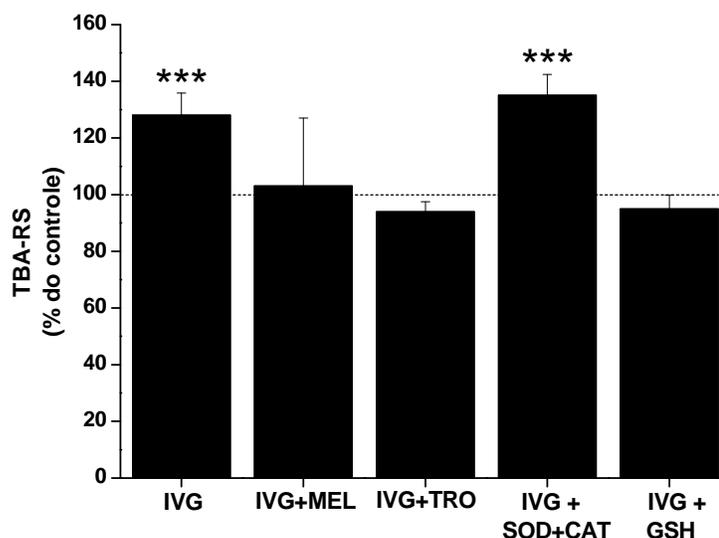


Figura 4.14 – Efeito de altas concentrações de melatonina (MEL, 1 mM), trolox (TRO, 10 μ M), combinação de superóxido dismutase (SOD, 15 mU/mL) e catalase (CAT, 15 mU/mL) e glutathiona (GSH, 750 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4-8) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $4,46 \pm 0,26$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (***) $P < 0,001$, comparado ao controle).

Visto que a NAC foi o único antioxidante capaz de prevenir o aumento de níveis de TBA-RS causado pela IVG e que esse composto atua como um importante precursor da glutathiona (GSH), avaliamos o efeito da isovalerilglicina sobre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, representadas pela medida das concentrações de glutathiona reduzida (GSH).

4.4 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A figura 4.15 mostra que o IVA, em concentrações tão altas quanto 10 mM, não alterou significativamente as concentrações de GSH em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F_{(5,18)} = 1,000$; $P > 0,05$]. Por outro lado, nossos resultados mostram que a IVG diminuiu significativamente (20%) as concentrações de GSH a partir da concentração de 0,5 mM [Figura 4.16: $F_{(5,18)} = 4,373$; $P < 0,01$] de forma dose dependente [$\beta = 0,703$; $P < 0,001$].

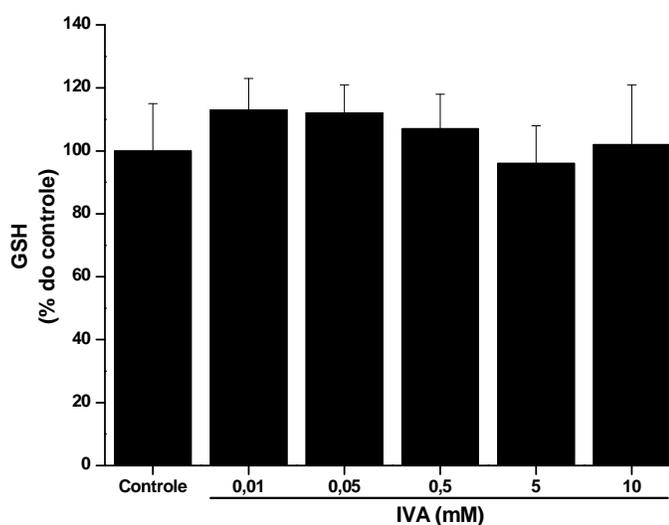


Figura 4.15 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $4,54 \pm 0,69$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

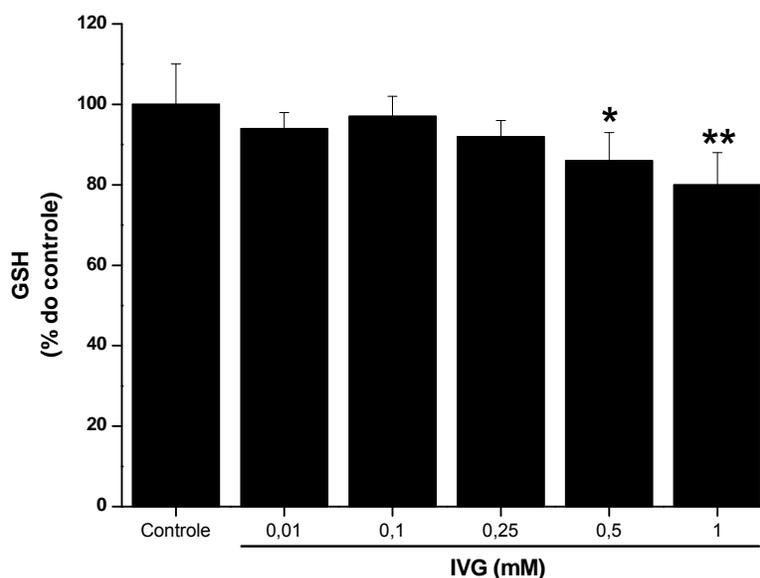


Figura 4.16 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $8,09 \pm 0,82$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan ($*P<0,05$, $**P<0,01$, comparado ao controle).

4.5 Efeito da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação de glutathiona (GSH) comercial purificada

Com a finalidade de verificar uma interferência ou uma ação antioxidante direta da IVG sobre o GSH, testamos o efeito desse composto (IVG, 1 mM), bem como da N-etilmaleimida (NEM, 250 μ M) sobre o conteúdo de GSH (200 μ M)

purificado e obtido comercialmente. Verificamos que a incubação da IVG por 1 hora não foi capaz de alterar os níveis de GSH, indicando que a IVG não é um oxidante direto e que não interfere no ensaio para a medida dos níveis de GSH [$F_{(2,6)} = 86,892$, $P > 0,001$ (Figura 4.17). Por outro lado, o NEM (250 μM) provocou uma redução dramática (> 80%) dos níveis de GSH.

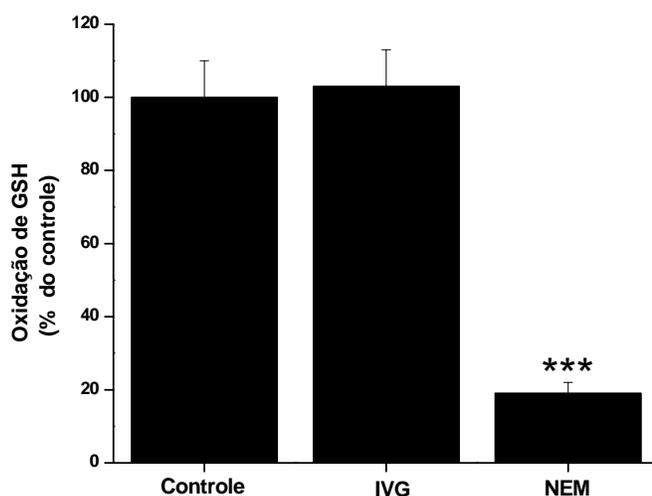


Figura 4.17 – Efeito *in vitro* da IVG (1 mM) e da NEM (250 μM) sobre o conteúdo de GSH (200 μM) purificado. Os valores estão expressos como porcentagem do controle. A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Duncan (** $P < 0,001$, comparado ao controle).

Estudamos também o efeito do IVA e da IVG sobre outras defesas antioxidantes (potencial antioxidante total - TRAP e a reatividade antioxidante total -TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.

4.6 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Nossos resultados demonstram que o IVA (0,5-10mM) [Figura 4.18: $F_{(3,12)} = 0,310$; $P > 0,05$] e a IVG (0,01-1mM) [Figura 4.19: $F_{(3,16)} = 0,400$; $P > 0,05$] não alteraram significativamente o TRAP em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

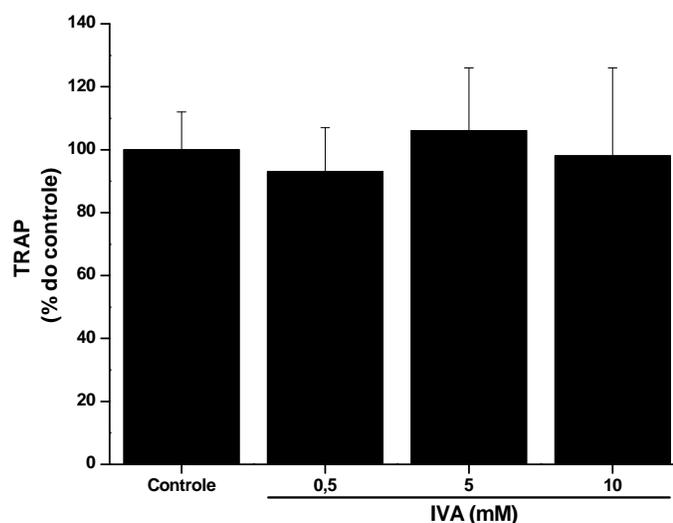


Figura 4.18 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=4$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $13,3 \pm 1,34$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

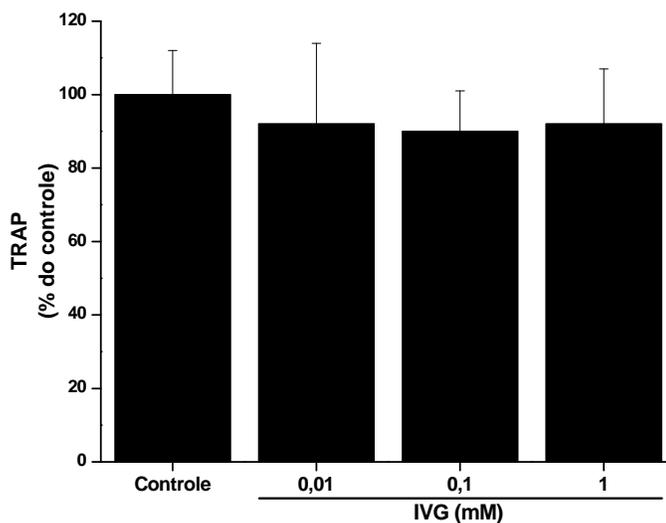


Figura 4.19 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $16,35 \pm 1,73$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.7 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Nossos resultados demonstram que o IVA (1-10mM) [Figura 4.20: $F_{(3,12)} = 0,290$; $P > 0,05$] e a IVG (0,01-1mM) [Figura 4,21: $F_{(3,16)} = 0,015$; $P > 0,05$], não alteraram significativamente a medida do TAR em homogenizado de córtex cerebral.

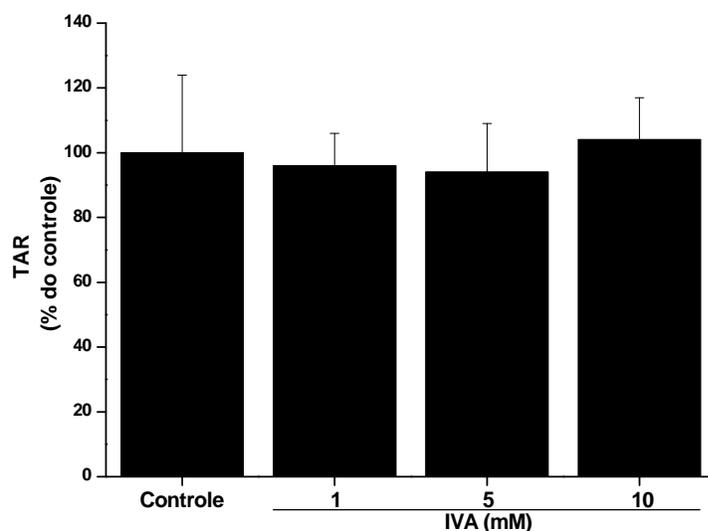


Figura 4.20 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=4) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $38,58 \pm 9,12$ nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

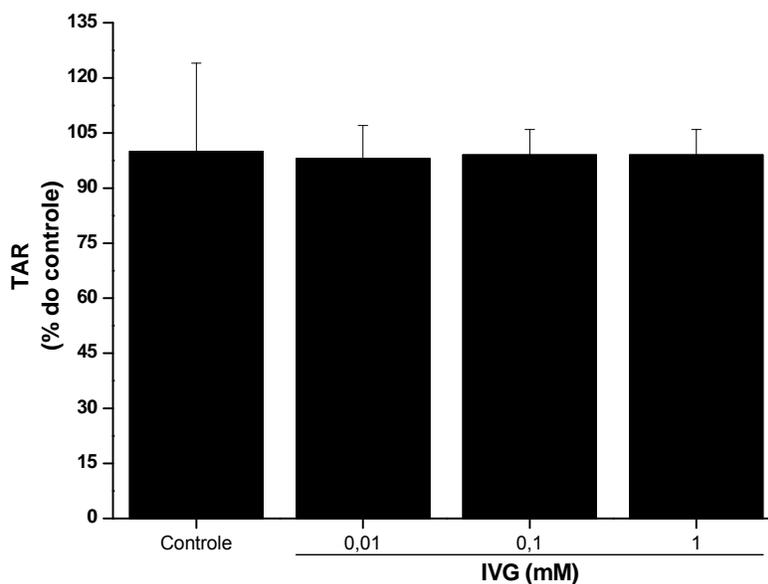


Figura 4.21 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: 26,9 \pm 6,4 nmol de Trolox / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

A seguir, estudamos o efeito do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a geração de espécies reativas avaliada pela oxidação da 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-DA) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.8 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação da 2,7-diclorofluoresceína-diacetato em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

Nossos resultados demonstram que o IVA (10 mM) e a IVG (1 mM) não modificaram significativamente a oxidação do DCFH-DA em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [Figura 4.22: $F_{(2,12)}=0,121$; $P > 0,05$].

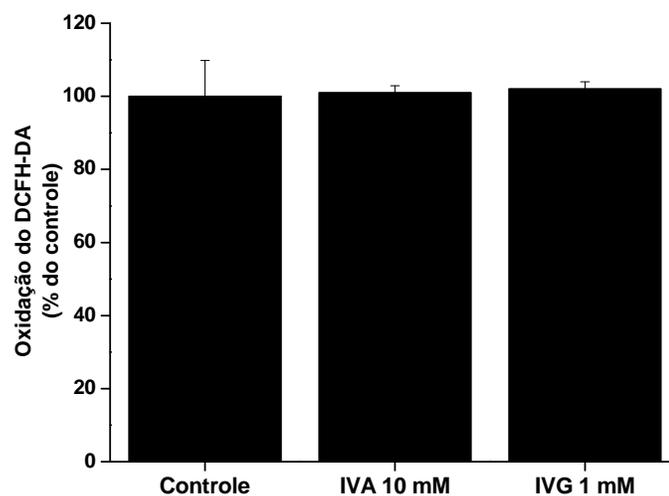


Figura 4.22 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação do DCFH-DA em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão ($n=5$) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $685 \pm 68,2$ pmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Estudamos então o efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação de proteínas, medida através da determinação do conteúdo dos grupamentos sulfidrila e da formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

4.9 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovaleriglicina (IVG) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens

A Figura 4.23 mostra que o IVA (0,01-10mM) não alterou significativamente a medida de grupamentos sulfidrila em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens [$F_{(5,30)} = 1,488$; $P > 0,05$], o mesmo ocorrendo para a IVG (0,01-1mM) [Figura 4.24: $F_{(5,24)} = 1,506$; $P > 0,05$].

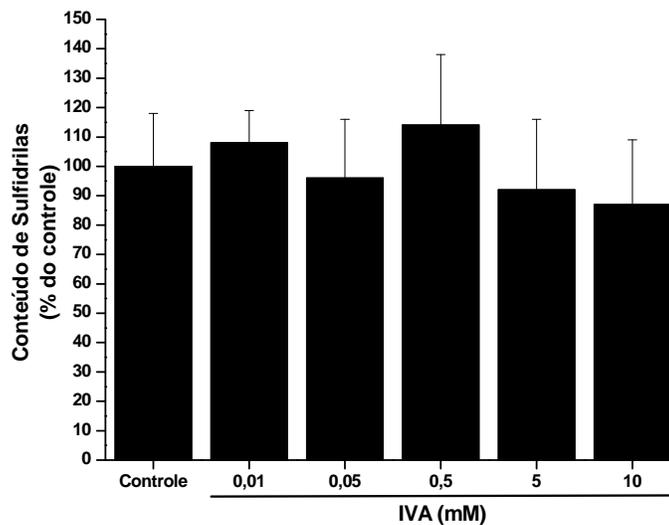


Figura 4.23 – Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidrilas em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=6) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $65,3 \pm 10,2$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

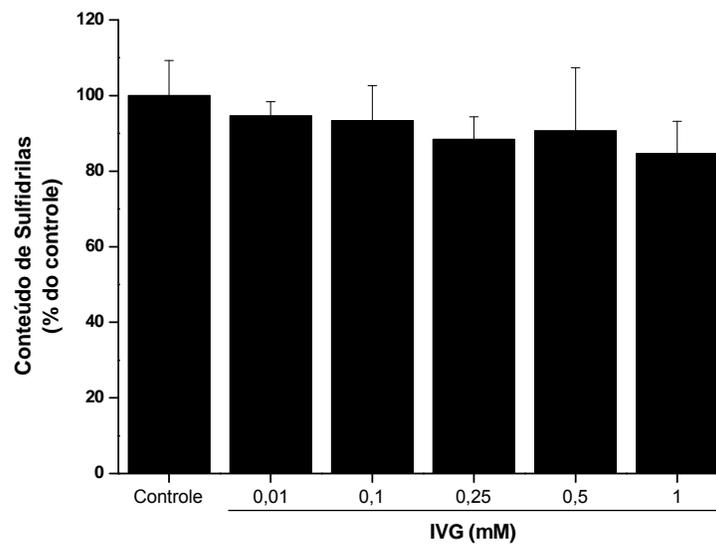


Figura 4.24 – Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre a medida de grupos sulfidrilas em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e estão expressos como porcentagem do controle (Controle: $65,6 \pm 6,08$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

4.10 Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a formação de carbonilas em homogeneizado de córtex cerebral de cérebro de ratos jovens

A Figura 4.25 demonstra que o IVA, nas concentrações de 5 e 10 mM, aumentou significativamente (70-90%) a formação de carbonilas [$F_{(3,23)} = 7,186$; $P < 0,01$] de forma dose dependente [$\beta = 0,656$; $P < 0,001$]. Contudo, verificamos que a IVG (0,25-1mM) não alterou significativamente esse parâmetro [Figura 4.26: $F_{(3,16)} = 0,813$; $P > 0,05$].

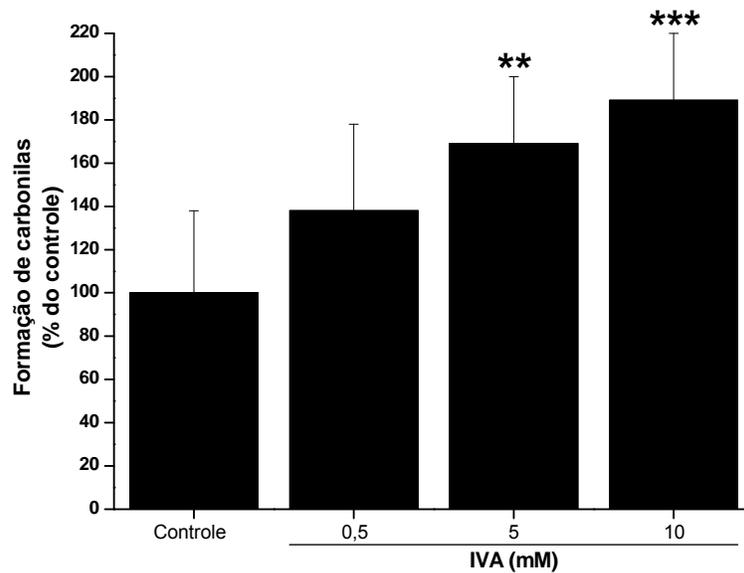


Figura 4.25 - Efeito *in vitro* do ácido isovalérico (IVA) sobre a formação de carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=6) e os resultados expressos em porcentagem do controle ($0,41 \pm 0,16$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Duncan (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, comparado ao controle).

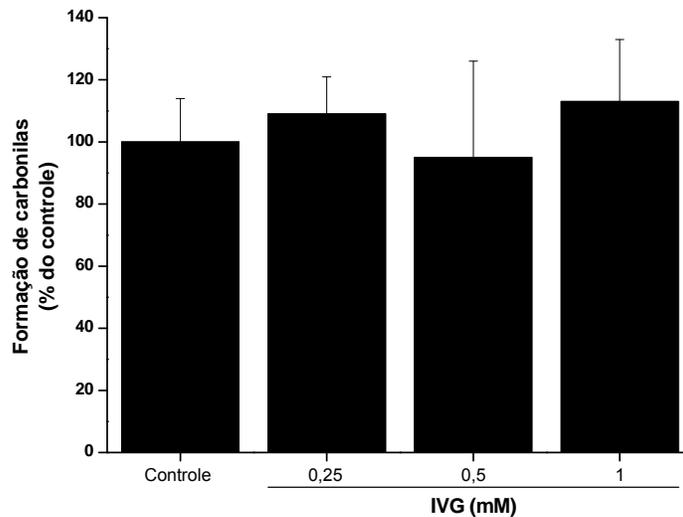


Figura 4.26 - Efeito *in vitro* da isovalerilglicina (IVG) sobre a formação de carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens.

Os valores representam média \pm desvio padrão (n=5) e foram expressos em porcentagem do controle ($1,57 \pm 0,21$ nmol / mg de proteína). A diferença entre as médias foi calculada por análise de variância de uma via (ANOVA). Não houve diferença significativa entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

A acidemia isovalérica é uma doença hereditária neurometabólica do catabolismo do aminoácido leucina, com transmissão autossômica recessiva, causada pela deficiência da atividade da enzima isovaleril-CoA desidrogenase (TANAKA *et al.*, 1966, SWEETMAN e WILLIAMS, 2001), levando ao acúmulo preponderante dos ácidos isovalérico (IVA), 3-hidroxiisovalérico (3-OHIVA) e da isovalerilglicina (IVG). As concentrações de IVA atingem 5 mM no sangue dos pacientes, principalmente durante episódios agudos, enquanto as do 3-OHIVA e IVG são menores (TANAKA *et al.*, 1966; SWEETMAN e WILLIAMS, 2001; SCRIVER *et al.*, 2001, VOCKLEY e ENSENAUER, 2006).

Existem dois fenótipos clínicos freqüentes da acidemia isovalérica, ambos devidos ao mesmo defeito bioquímico. São eles a forma neonatal, grave, aguda e a forma crônica, menos grave, com início de apresentação mais tardio (SWEETMAN e WILLIAMS, 2001; SCRIVER *et al.*, 2001). Em ambos os variantes, os sintomas neurológicos, como hipotonia, letargia, coma e convulsões são predominantes. Os achados laboratoriais são de acidose metabólica, moderada cetonúria, acidemia/acidúria láctica e hiperamonemia (FISCHER *et al.*, 1981). Um terceiro variante foi recentemente descrito com um fenótipo bioquímico leve (VOCKLEY e ENSENAUER, 2006).

Apesar de sintomas clínicos serem predominantemente neurológicos, a fisiopatogenia do dano cerebral nesta doença é pouco conhecida. Porém, o acúmulo de metabólitos tóxicos na acidemia isovalérica pode potencialmente contribuir para a neuropatogênese dessa patologia. Assim, se faz necessária uma

investigação do papel dos metabólitos acumulados na acidemia isovalérica sobre a função do sistema nervoso central. Recentemente, foi demonstrado que o ácido 3-hidroxiisovalérico, que também está acumulado nos pacientes com acidemias 3-metilglutacônica e 3-hidroxi-3-metilglutárica induz estresse oxidativo em cérebro de ratos (LEIPNITZ *et al.*, 2008 a,b). Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos *in vitro* do IVA e da IVG sobre alguns parâmetros importantes de estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos jovens. Testamos o efeito destes metabólitos (0,1-10 mM IVA e 0,01-1 mM IVG) sobre o dano oxidativo lipídico (TBA-RS e quimiluminescência) e protéico (oxidação de sulfidrilas e formação de carbonilas), bem como sobre a oxidação do DCFH-DA e sobre o conteúdo das defesas antioxidantes não enzimáticas GSH, TRAP, TAR em homogeneizado de córtex cerebral. Enfatize-se que as concentrações dos metabólitos acumulados na acidemia isovalérica aumentam dramaticamente durante crises de descompensação metabólica.

Verificamos inicialmente que o IVA em concentrações tão altas quanto 10 mM não alterou a peroxidação lipídica, enquanto a IVG em concentrações a partir de 0.5 mM aumentou significativamente as medidas de TBA-RS (35-40 %) e quimiluminescência (30%). No ensaio de quimiluminescência, a luz é proveniente principalmente de carbonilas excitadas, íon superóxido, peronitrito e de lipídios peroxidados e a medida do TBA-RS reflete a quantidade de malonodialdeído formado que é o produto final da peroxidação de ácidos graxos das membranas celulares (HALLIWEL e GUTERIDGE, 2007 a, b). Portanto, os valores aumentados destes compostos indicam que a IVG causou oxidação *in vitro* dos lipídios presentes nos homogeneizados no córtex cerebral.

Com a finalidade de investigar se este efeito foi devido à glicina (1-5 mM) que faz parte da molécula de IVG, testamos o efeito deste aminoácido sobre os mesmos parâmetros e verificamos que este aminoácido também induziu dano oxidativo lipídico nesta estrutura cerebral ao aumentar o TBA-RS (25%) e a quimiluminescência (23%). Tais resultados evidenciam a necessidade de se investigar com profundidade a ação da glicina sobre a produção de espécies ativas no cérebro, visto que esse aminoácido é utilizado no tratamento para a acidemia isovalérica por se ligar ao ácido isovalérico e excretá-lo na urina mais facilmente. Além disso, níveis teciduais aumentados de glicina são também encontrados nas doenças hiperglicinemia não cetótica e hiperglicinemia cetótica, esta última presente nas acidemias metilmalônica e propiônica em que já foi detectado indução de estresse oxidativo (MOYANO *et al.*, 1997; FONTELLA *et al.*, 2000).

Seguimos nossa investigação procurando determinar quais espécies ativas estavam envolvidas no efeito do IVG. Desta forma, co-incubamos os homogeneizados com IVG (1 mM) e os antioxidantes trolox (TRO, 1,5 µM), melatonina (MEL, 200 µM), glutathione (GSH, 100 µM), Nω-nitro-L-arginina (LNAME, 500 µM), N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), combinação de catalase (CAT, 2,5 mU/mL) e superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) ou creatina (Cr, 3,0 mM) nas doses usualmente utilizadas em estudos *in vitro* para prevenir ou reverter aumento da produção de espécies ativas evidenciado pelo aumento da medida TBA-RS (LEIPNITZ *et al.*, 2008 a,b). Verificamos que nestas concentrações somente a N-acetilcisteína, que é precursora da formação de GSH e facilmente cruza membranas celulares, foi capaz de reverter o efeito estimulatório da IVG

sobre os níveis de TBA-RS. O fato do GSH não ter sido capaz de prevenir este efeito, contrariamente à N-acetilcisteína, pode ser atribuído ao fato de que o mesmo tem dificuldade de atravessar membranas celulares (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). O próximo passo foi repetir os mesmos ensaios com doses maiores dos antioxidantes. Nossos resultados mostraram que, com exceção da combinação SOD e CAT, todos os outros antioxidantes reverteram completamente o aumento da lipoperoxidação causada pelo IVG. Neste particular, enfatize-se que em altas doses vários antioxidantes, inclusive GSH e SOD podem cruzar membranas celulares (RIUS *et al.*, 2003). Concluímos que as espécies ativas superóxido e/ou peróxido de hidrogênio não foram responsáveis pelo dano oxidativo lipídico causado pelo IVG, visto que a combinação SOD e CAT não reverteu o efeito da IVG. Por outro lado, é possível que os radicais hidroxila e peroxila estejam envolvidos com o efeito do IVG, já que os antioxidantes que seqüestram estas espécies ativas preveniram totalmente a peroxidação lipídica induzida pela IVG.

Verificamos também que o IVA e a IVG não modificaram a oxidação do DCFH-DA em doses tão altas quanto 10 mM e 1 mM, respectivamente. No entanto, deve-se frizar que a fluorescência detectada pelo aumento de DCF é um ensaio pouco sensível, e sendo alterado principalmente pelos radicais hidroxila e peroxinitrito. Assim sendo, os presentes resultados sugerem, portanto, que a IVG provavelmente não induz superprodução das espécies ativas peroxinitrito e hidroxila que são mais facilmente detectadas por este ensaio (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

O próximo passo de nossa investigação foi determinar a influência do IVA e da IVG sobre o sistema de defesa antioxidante no cérebro. Verificamos inicialmente que o IVA não modificou, enquanto a IVG provocou uma diminuição significativa dos níveis do glutathiona reduzida GSH (20%). Tais resultados estão de acordo com o fato de que a N-acetilcisteína, substrato para a formação de GSH, foi capaz de em concentrações relativamente baixas prevenir o aumento da lipoperoxidação lipídica induzida pelo IVG. Verificamos também que o IVA (0,5-10mM) e a IVG (0,01-1mM) não afetaram as medidas de TRAP e TAR que representam o potencial antioxidante total e a reatividade antioxidante total, respectivamente. Apesar de até o momento não termos uma explicação para esses resultados aparentemente discrepantes, é possível que a redução de GSH não foi capaz de alterar o valor total das defesas antioxidantes não enzimáticas medidas pelo TRAP e pelo TAR. Por outro lado, relembramos que, o efeito da IVG diminuindo os níveis cerebrais de GSH não se deveu a uma ação oxidante direta do metabólito ou à interferência do mesmo no ensaio de medida do conteúdo de GSH, já que a exposição de GSH comercial com IVG por 1 hora não alterou as concentrações de GSH. Concluimos que a IVG reduziu os níveis de GSH provavelmente devido à formação aumentada de radicais livres e oxidantes induzidos pelo composto.

Verificamos também que o IVG não induziu dano oxidativo protéico medido pela oxidação de sulfidrilas e pela formação de carbonilas, enquanto o IVA causou um aumento significativo na formação de carbonilas (90 %), sem alterar os níveis de tióis. Tendo em vista que a quantificação de carbonilas tem servido como um dos testes para se avaliar dano oxidativo protéico (DALLE-DONNE *et al.*, 2003),

tais resultados sugerem que o IVA induziu oxidação protéica. Devemos, no entanto, considerar que o ensaio das carbonilas não é um marcador específico para dano oxidativo protéico, visto que aldeídos e proteínas glicadas também interferem neste parâmetro (UCHIDA, 2003). Daí, não se poder excluir totalmente a possibilidade de que aldeídos formados a partir de IVA possam ter contribuído com o aumento do conteúdo de carbonilas.

Tendo em vista que a IVG induz lipoperoxidação e redução de GSH provavelmente secundários à maior formação de espécies ativas e que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies ativas em um tecido (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007 a,b), concluímos que o IVG causa estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens.

Devemos também enfatizar que o cérebro possui poucas defesas antioxidantes, além de uma maior quantidade de lipídios insaturados (suscetíveis à oxidação) e de ferro, que induz a formação de radicais livres através da reação de Fenton, quando comparado com outros tecidos, tornando-o mais suscetível ao ataque por radicais livres (HALLIWELL e GUTERIDGE, 2007c).

Por outro lado, é difícil determinar a relevância fisiopatológica de nossos resultados, visto que não são conhecidas as concentrações cerebrais dos principais metabólitos acumulados na acidemia isovalérica.

Concluindo, os presentes achados indicam que a IVG, um dos metabólitos acumulados na acidemia isovalérica, induz estresse oxidativo (aumento da peroxidação lipídica e diminuição do GSH) *in vitro* em córtex cerebral de ratos jovens, enquanto o IVA é potencialmente capaz de provocar dano oxidativo

proteico. Um aumento do estado pró-oxidante e uma menor capacidade antioxidante, representada pelo decréscimo do GSH cerebral, indica que o estresse oxidativo possa representar um mecanismo na fisiopatologia do dano neurológico característico da acidemia isovalérica. No entanto, convém salientar que o grau do dano oxidativo provocado por estes metabólitos e observado no presente estudo foram modestos, quando comparados com outros metabólitos acumulados em outras acidemias orgânicas (LEIPNITZ *et al.*, 2008 a,b). Estudos adicionais *in vivo* sobre os efeitos desses metabólitos em modelos animais de acidemia isovalérica, bem como a medida de parâmetros de estresse oxidativo em tecidos de pacientes portadores dessa doença seriam, portanto, interessantes para confirmar nossos resultados *in vitro* e melhor avaliar se esse mecanismo é de fato, importante na patogênese da acidemia isovalérica.

6. CONCLUSÕES

1) O ácido isovalérico (IVA) em concentrações tão altas quanto 10 mM não alterou significativamente a medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), enquanto a isovalerilglicina (IVG), em concentrações a partir de 0.5 mM e a glicina (GLI), em concentrações a partir de 2,5 mM, aumentaram significativamente de forma dose dependente as medidas de TBA-RS em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

2) O IVA (0,01-10mM) não alterou significativamente a quimiluminescência, enquanto a IVG na concentração de 1 mM e a GLI na concentração de 5 mM aumentaram significativamente a quimiluminescência em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

3) Os antioxidantes trolox (TRO, 1,5 μ M), melatonina (MEL, 200 μ M), glutathione (GSH, 100 μ M), N ω -nitro-L-arginina (LNAME, 500 μ M), combinação de catalase (CAT, 2,5 mU/mL) e superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) e creatina (Cr, 3,0 mM) em doses usualmente utilizadas em estudos in vitro para prevenir ou reverter aumento da produção de espécies ativas não revertem o aumento de TBA-RS induzido por IVG (1 mM). No entanto, a N-acetilcisteína (NAC, 1 mM), que é precursora da formação de GSH e facilmente cruza membranas celulares, foi capaz de reverter o efeito estimulatório da IVG sobre os níveis de TBA-RS.

4) Doses maiores dos antioxidantes MEL-1 mM, TRO-10 μ M e GSH-750 μ M, com execução da combinação SOD-15 mU/mL e CAT-15 mU/mL, foram capazes de prevenir completamente a indução de lipoperoxidação causada pelo IVG.

5) O IVA (0,01-10mM) não modificou, enquanto a IVG, nas concentrações de 0,5 mM e 1 mM provocaram uma diminuição dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

6) A diminuição das concentrações de GSH não se deveu à uma ação oxidante direta da IVG e tampouco a uma interferência da IVG na medida do GSH.

7) O IVA (0.5-10mM) e a IVG (0,01-1Mm) não alteraram o potencial antioxidante total (TRAP), bem como a reatividade antioxidante total (TAR) em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

8) O IVA e a IVG, nas concentrações de 10 mM de 1 mM, respectivamente, não modificaram a oxidação do DCFH-DA em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

9) O IVA (0.01-10 mM) e a IVG (0,01-1 mM) não alteraram a concentração (oxidação) de grupamentos sulfidrilica em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

10) O IVA, nas concentrações de 5 e 10 mM, aumentou significativamente e de forma dose-dependente a formação de carbonilas, sendo que a IVG (0,25-1mM) não foi capaz de alterar significativamente este parâmetro em homogeneizados de córtex cerebral de ratos jovens.

11) Concluindo, IVG, metabólito acumulado na acidemia isovalérica, induz estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos jovens in vitro, o que pode estar relacionado com a fisiopatologia do dano cerebral que ocorre nos pacientes afetados por esta doença.

7. BIBLIOGRAFIA

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. *Changes in thiol content and expression glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease.* Neurosci. Lett. 302, 141-145, 2001.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C. V.; FAULL, R. L.; WILLIAMS, C. E.; CLARK, R.G.; GLUCKMAN, P. D.; HUGHES, P. E. *Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases.* Prog. Neurobiol. v. 60, p. 409-470, 2000.

BARTLETT, K.; GOMPertz, D. *The specificity of glycine-N-acylase and acylglycine excretion in the organic acidemias.* Biochemi. Med. v. 10, p. 15, 1974.

BECKMAN, K.B., AMES, B.N. *The free radical theory of aging matures.* Physiology Reviews. v. 78(2), p.547-81, 1998.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. *Chemistry, physiology and pathology of free radicals.* Life Sci. v. 65, p. 1865-1874, 1999.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* Biochem. J. v. 134, p. 707-716, 1973.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. *Reduced glutathione and glutathione disulfide.* Methods Mol. Biol. v. 108, p. 347-352, 1998.

BUDD, M.A.; TANAKA, K.; HOLMES, L.B.; EFRON, M.L.; CRAWFORD, J.D.; ISSELBACHER, K.J. *Isovaleric acidemia – clinical features of a new genetic defect of leucine metabolism.* N. Engl. J. Med. v. 277, p. 321, 1967.

BURTON, B.K. *Inborn Errors of Metabolism: The clinical diagnosis in early infancy.* Pediatrics. v. 79, p. 359, 1987.

CHALMERS, R.A.; LAWSON, A.M. *Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias.* London: Chapman & Hall, p. 221-229, 1982.

CHALMERS, R.A.; PURKISS, P.; WATTS; *et al.* Screening for organic acidurias and amino acidopathies in newborns and children. *J. Inher. Metab. Dis.*, v. 3, p. 27-29, 1980.

COHN, R.N.; YUDKOFF, M.; ROTHMAN, R.; SEGAL, S. *Isovaleric acidemia: Use of glycine therapy in neonates.* N Engl J Med, v. 299, p. 996, 1978.

DE SOUZA, C.; CHALMERS, R. A.; STACEY, T. E.; TRACEY, B. M.; WEAVER, C. M.; BRADLEY, D. *The response to L-carnitine and glycine therapy in isovaleric acidemia*. Eur J Pediatr, v. 144, p. 451, 1986.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. *Protein carbonylation in human diseases*. Trends Mol.Med., v.9, pg.169-176, 2003.

DELANTY, N.; DICHTER, M. A. *Oxidative injury in the nervous system*. Acta Neurol. Scand. v. 98, p. 145-153, 1998.

DIONISI-VICI, C.; DEODATO, F.; ROSCHINGER, W.; RHEAD, W.; WILCKEN, B. *'Classical' organic acidurias, propionic aciduria, methylmalonic aciduria and isovaleric aciduria: long-term outcome and effects of expanded newborn screening using tandem mass spectrometry*. J Inherit Metab Dis., Review, v. 29(2-3): p.383-389, 2006.

DUBIEL, B.; DABROWSKI, C.; WETTS, R.; TANAKA, K. *Complementation studies of isovaleric acidemia and glutaric aciduria type II used cultured skin fibroblasts*. J Clin Invest, v. 72, p. 1543, 1983.

ELSAS, L.J.; NAGLAK, M. *Acute and chronic-intermittent isovaleric acidemia: diagnosis and glycine therapy*. Acta Pediatric Japonica. v.30, n.4, p.442 - 51, 1988.

ENSENAUER, R.; VOCKLEY, J.; WILLARD J.M.; HUEY, J.C.; SASS, J.O.; EDLAND, S.D.; BURTON, B.K.; BERRY, S.A.; SANTER, R.; GRUNERT, S.; KOCH, H.G.; MARQUARDT, I.; RINALDO, P.; HAHN, S.; MATERN, D. *A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening*. Am J Hum Genet. v.75: p.1136-1142, 2004.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal*. Meth. Enzymol. v. 186, p. 407-421, 1990.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LIESUY, S.; LISSI, E.A. *Evaluation of total reactive antioxidant potencial (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols*. Arch. Biochem. Biophys. v. 388, p. 261-266, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. Rev. Ass. Med. Brasil. v. 43, p. 61-68, 1997.

FRIES, M. H.; PIERO, R.; SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; JURECKI, E.; PACKMAN, S. *Isovaleric acidemia: Response to a leucine load after three weeks of supplementation with glycine, L-carnitine, and combined glycine-carnitine therapy*. Journal of Pediatrics.v.129(3): p.449-452, 1996.

FISCHER, A. Q.; CHALLA, V. R.; BURTON, B. K.; MCLEAN W. T. *Cerebellar hemorrhage complicating isovaleric acidemia: A case report*. Neurology, v. 31, p. 746, 1981.

FONTELLA, FU.; PULROLNIK, V.; GASSEN, E.; WANNMACHER, CM.; KLEIN, AB.; WAJNER, M.; DUTRA-FILHO, CS. *Propionic and L-methylmalonic acids induce oxidative stress in brain of young rats*. Neuroreport. V.11(3): p.541-544, 2000.

GERDES, A.M.; GREGERSEN, N.; LUDVIGSSON, P.; GUTTLER, F. A *Scandinavian case of isovaleric acidemia*. J. Inherit. Metab. Dis., v. 11, p. 218, 1988.

GREGERSEN, N.; KOLVRAA, S.; MORTENSEN, P.B. *Acyl-CoA: glycine N-acyltransferase: in vitro studies on the glycine conjugation of straight- and branched-chained acyl-CoA esters in human liver*. Biochem. Med. Metab. Biol. v. 35, p. 210, 1986.

GONZÁLEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. *Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle*. Free Radic. Biol. Med. v. 10, p. 93-100, 1991.

GU, M.; GASH, M. T.; MANN, V. M.; JAVOY-AGID, F.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. *Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus*. Ann. Neurol. v. 39, p. 385-389, 1996.

HALLIWELL, B. *Free radicals, protein and DNA: oxidative damage versus redox regulation*. Biochem. Soc. Trans. 24: 1023-1027, 1996.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN M.; *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do results mean?* British Journal of Pharmacology. v.142, p.231-255, 2004.

HALLIWELL, B. *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases*. Drugs and Aging. v.18, p. 685 - 716, 2001.

HALLIWELL, B. *Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?* Journal of Neurochemistry. v. 97(6), p.1634-58, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. *Measurement of reactive species*. In: Halliwell, B., Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. p. 268-340, 2007a.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. *Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence ad death*. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. p. 187-267, 2007b.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JM.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4.ed. New York: Oxford University Press Inc., 2007c.

HINE, D. G.; HACK, A. M.; GOODMAN, S. I.; TANAKA, K. *Stable isotope dilution analysis of isovaleryl-glycine in amniotic fluid and urine and its application for the prenatal diagnosis of isovaleric acidemia*. *Pediatr Res*, v. 20, p. 222, 1986.

HOFFMANN, G.F.; VON KRIES, R.; KLOSE, D.; *et al.* *Frequencies of inherited organic acidurias and disorders of mitochondrial fattyacid transport and oxidation in Germany*. *Eur. J. Pediatr.*, v. 163, p. 76-80, 2004.

HYMAN, D. B.; TANAKA, K. *Isovaleryl-CoA Dehydrogenase activity in isovaleric acidemia fibroblasts using and improved tritium release assay*. *Pediatr Res*, v.20, p. 59, 1986.

JANETSKY, B.; HAUCK, S.; YODIM, M. B. H.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K.; PANTUCEK, F.; ZOCHLING, R.; BOISSEL, K. W.; REICHMANN, H. *Unaltered aconitase activity but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease*. *Neurosci. Lett.* v. 169, p. 126-128, 1994.

KRIEGER, I.; TANAKA, K. *Therapeutic effects of glycine in isovaleric acidemia*. *Pediatric. Res.*, v. 10, p. 25, 1976.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. *Chem. Res. Toxicol.* v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE, P.J.; HARRISON, E.L.; JONES, M.G.; CHALMERS, R.A.; LEONARD, J.V.; WHIPP, B.J. *Improvement in exercise tolerance in isovaleric acidemia with L-carnitine therapy*. *J. Pediatr.*, v. 21, p. 136, 1998.

LEIPNITZ, G.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, AU.; BORTOLI, G.; SOLANO, A.; SCHUCK, PF.; WYSE, AT.; WANNMACHER,CM.; LATINI, A.; WAJNER, M. *Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats*. *Life Sci.*, v. 82(11-12): p.652-62, 2008a.

LEIPNITZ, G.; SEMINOTTI B.; HAUBRICH J.; DALCIN, M.B; DALCIN, K.B; SOLANO, A; BORTOLI, G.; AMARAL, A.; DUTRA-FILHO, C.S.; LATINI, A; WAJNER, M. *Evidence that 3-hydroxy-3-methylglutaric acid promotes lipid and protein oxidative damage and reduces the nonenzymatic antioxidant defenses in rat cerebral cortex*. *Journal of Neuroscience research*, v. 86 (3), p. 683-93, 2008b.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. *Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis*. *Free Rad. Res. Comm.* v. 17, p. 299-311, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. *Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements*. Free Rad. Biol. Med. v. 18, p. 153-158, 1995

LOVELL, M. A.; XIE, C.; MARKESBERY, W. R. *Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain*. Brain Res. v. 855, p. 116-123, 2000.

LOOTS, DT.; ERASMUS, E.; MIENIE, LJ. *Identification of 19 new metabolites by induced by abnormal amino acid conjugation in isovaleric acidemia*. Clin Chem, v.51: p.1510–1512, 2005.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J Biol Chem, v. 193, p. 265-75, 1951.

MARK, R. J. *Common mechanisms of oxidative damage in chronic neurodegenerative conditions: potential points of therapeutic intervention*. Exp. Opin. Ther. Patents, v. 9, p. 1339-1346, 1999.

MARKESBERY, W. R.; CARNEY, J. M. *Oxidative alterations in Alzheimer's disease*. Brain Pathol. v. 9, p. 133-146, 1999.

MAYATEPEK, E.; HOFFMANN, G.F.; BAUMGARTNER, R.; *et al.* *Atypical vitamin B₁₂-unresponsive methylmalonic aciduria in a sibship with severe progressive encephalomyopathy: a new genetic disease?* Eur. J. Pediatr., v. 155, p. 398-403, 1996.

MAYATEPEK, E.; KURCZYNSKI, T.W.; HOPPEL, C.L. *Long-term L-carnitine treatment in isovaleric acidemia*. Pediatr Neurol., v. 7, p. 137, 1991.

MAXWELL, S. R. J. *Prospects for the use of antioxidant therapies*. Drugs v. 49, p. 345-361, 1995.

MILLINGTON, D.S.; KODO, N.; NORWOOD, D.L.; ROE, C.R. *Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism*. J. Inherit. Metab. Dis., v. 13, p. 321, 1990.

MOHSEN, AW.; ANDERSON, BD.; VOLCHENBOUM, SL.; BATTAILE, KP.; TIFFANY, K.; ROBERTS, D.; KIM, JJ.; VOCKLEY, J. *Characterization of molecular defects in isovaleryl-CoA dehydrogenase in patients with isovaleric acidemia*. Biochemistry. V. 37(28): p. 10325-35, 1998.

MOYANO, D.; VILASECA, M.A.; PINEDA, M.; CAMPISTOL, J.; VERNET, A.; PÓO, P.; ARTUCH, R.; SIERRA, C. *Tocopherol in inborn errors intermediary metabolism*. Clin. Chim. Acta. 263, p. 147-155, 1997.

NASSER, I.; MOHSEN, AW.; JELESAROV, I.; VOCKLEY, J.; MARCHEROUX, P.; GHISLA, S. *Thermal unfolding of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase and iso(3)valeryl-CoA dehydrogenase: Study of the effect of genetic defects on enzyme stability.* Biochim Bio-phys Acta, p.1690:22–32, 2004.

NOUROOZ-ZADEH, J.; LIU, E. H.; YHLEN, B.; ANGGARD, E. E.; HALLIWELL B. *F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease.* J. Neurochem. v. 72, p.734-740, 1999

RASHED, M.; OZAND, P.T.; AQEEL, A.; *et al.* *Experience of King Faisal Specialist Hospital and Research Center with organic acid disorders.* Brain. Develop., v. 16, p. 1-6, 1994.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. *Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay.* Methods enzymol, 233, 357-363, 1994.

RHEAD, W.J.; HALL, C.L.; TANAKA, K. *Novel tritium release assays for isovaleryl-CoA and butyryl-CoA dehydrogenase.* J. Biol. Chem., v. 256, p. 1616, 1981.

RIUS, M.; NIES, A.T.; HUMMEL-EISENBEISS, J.; JEDLITSCHKY, G.; KEPPLER, D. *Contransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane.* Hepatology, v. 38, p.374-384, 2003.

RIBEIRO CA, BALESTRO F, GRANDO V, WAJNER M. *Isovaleric acid reduces Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats.* Cellular and Molecular Neurobiology. 27(4), p. 529-40, 2007.

ROE, C. R.; MILLINGTON, D. S.; MALTBY, D. A.; KAHLER, S. G.; BOHAN, T. P. *L-carnitine Therapy in isovaleric acidemia.* J Clin Invest, v. 74, p. 2290, 1984.

ROSE, C. D.; HENNEBERRY, R. C. *Etiology of the neurodegenerative disorders: a critical analysis.* Neurobiol. Aging. v. 15, p. 233-234, 1994.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.* Lancet. v. 1, p. 1269, 1989.

SCHAPIRA, A.H.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; *et al.* *Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.* J Neurochem, v. 54, p. 823-827, 1990a.

SCHAPIRA, A. H. V.; MANN, V. M.; COOPER, J. M. DEXTER, D.; DANIEL, S. E.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. *Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease.* J. Neurochem. v. 55, p. 2142-2145, 1990b.

SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, Inc.; 2001.

SHIGEMATSU, Y.; KIKAWA, Y.; SUDO, M.; KANAOKA, H.; FUJIOKA, M.; DAN, M. *Prenatal diagnosis of isovaleric acidemia by fast atom bombardment and tandem mass spectrometry*. *Clinical Chemistry Acta*. v.16, n.203, p.369-374, 1991.

SMITH, C. D.; CARNEY, J. M.; STARKE-REED, P. E.; OLIVER, C. N.; STADTMAN, E. R.; FLOYD, R. A.; MARKESBERY, W. R. *Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer's disease*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88, p. 10540-10543, 1991.

SWEETMAN, L.; WILLIAMS, J.C. *Branched chain organic acidurias*. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (Eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed., vol 2. New York: McGraw-Hill, Inc. p. 2125-2163; 2001.

SHIH, V. E.; AUBRY, R. H.; DEGRANDE, G.; GURSKY, S. F.; TANAKA, K. *Maternal isovaleric acidemia*. *J Pediatr*, v. 105, p. 77, 1984.

SHIH, V. E.; MANDELL, R.; TANAKA, K. *Diagnosis of isovaleric acidemia in cultured fibroblasts*. *Clin Chim Acta*, v. 113, p. 101, 1973.

SINCLAIR, L.A. *A new look at the inborn errors of metabolism*. *Ann. Clin. Biochem*. v. 19, p. 314-21, 1982.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. *Free radicals in medicine I. Chemical nature and biological reactions*. *Mayo Clin. Proc.* v. 63, p. 381-389, 1988.

TANAKA, K.; BUDD, M. A.; EFRON, M. L.; ISSELBACHER, K. J. *Isovaleric acidemia: A new genetic defect of leucine metabolism*. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 56, p. 236, 1966.

TANAKA, K.; ISSELBACHER, K.J. *The isolation and identification of N-isovalerylglycine from urine of patients with isovaleric acidemia*. *J. Biol. Chem.*, v. 242, p. 2966, 1967.

TANAKA, K.; ORR, J.C.; ISSELBACHER, K.J. *Identification of beta hydroxyisovaleric acid in the urine of a patient with isovaleric acidemia*. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 152, p. 638, 1968.

TANAKA, K.; MANDELL, R.; SHIH, V.E. *Metabolism of [1-¹⁴C] and [2-¹⁴C] leucine in cultured skin fibroblasts from patients with isovaleric acidemia*. *J. Clin. Invest.*, v. 58, p. 164, 1976.

TANAKA, K.; NEST-DULL, A.; HINE, D. G.; LYNN, T. B. ,LONE, T. *Gaschromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias.* Clin Chem, v. 26, p. 1847, 1980.

TANAKA, K.; ROSENBERG, L.E. *Disorders of Branched-Chain Amino Acid and Organic Acid Metabolism*, IN: STANBURY, J.B.; WYNGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. (eds): *The metabolic basis of inherited disease*, 5th ed New York, Mc-Graw-Hill, p.440, 1983.

TANAKA, K. *Inborn errors of branched-chain amino acid metabolism, in Odessy, R. (ed): Problems and Potential of Branched-Chain Amino Acids in Physiology and Medicine.* New York, Elsevier, p. 201, 1986.

UCHIDA, K.; *4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress.* Prog Lipid Res., 42, 318-343, 2003.

VOCKLEY J.; ENSENAUER, R. *Isovaleric acidemia: new aspects of genetic and phenotypic heterogeneity.* American J of Med Genet, part C Semin Med Genet. 142(C): p. 95-103, 2006.

WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free Radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. (Eds). *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.* New York: Churchill Livingstone, p. 765-777, 1995.

WILLIAMS, K.M.; PEDEN, V.H.; HILLMAN, R.E. *Isovaleric acidemia appearing as diabetic ketoacidosis.* Am. J. Dis. Child., v. 135, p. 1068, 1981.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Catabolismo da leucina.....	10
Figura 4.1	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	38
Figura 4.2	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens.	39
Figura 4.3	Efeito <i>in vitro</i> da glicina (GLI) sobre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral de ratos jovens..	40
Figura 4.4	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	41
Figura 4.5	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.....	42
Figura 4.6	Efeito <i>in vitro</i> da glicina (GLI) sobre a quimiluminescência em córtex cerebral de ratos jovens.	43
Figura 4.7	Efeito do trolox (α -tocoferol hidrossolúvel; TRO, 1,5 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.	45
Figura 4.8	Efeito da melatonina (MEL, 200 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.	46
Figura 4.9	Efeito da glutatona (GSH, 100 μ M) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela	

	isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.....	47
Figura 4.10	Efeito da N ^ω -nitro-L-arginina metiléster (L-NAME, 500 μM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.	48
Figura 4.11	Efeito da N-acetilcisteína (NAC, 1 mM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.	49
Figura 4.12	Efeito da combinação das enzimas superóxido dismutase (SOD, 2,5 mU/mL) e da catalase (CAT, 2,5 mU/mL) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.	50
Figura 4.13	E Efeito da creatina (Cr, 3 mM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.....	51
Figura 4.14	Efeito de altas concentrações de melatonina (MEL, 1 mM), trolox (TRO, 10 μM), combinação de superóxido dismutase (SOD, 15 mU/mL) e catalase (CAT, 15 mU/mL) e glutatona (GSH, 750 μM) sobre o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) causado pela isovalerilglicina (IVG, 1 mM) em córtex cerebral de ratos jovens.....	52
Figura 4.15	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	53
Figura 4.16	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre as concentrações de glutatona reduzida (GSH) em córtex cerebral de ratos jovens.....	54
Figura 4.17	Efeito <i>in vitro</i> da IVG (1 mM) e da NEM (250 μM) sobre o conteúdo de GSH (200 μM) purificado.....	55

Figura 4.18	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em córtex cerebral de ratos jovens.....	56
Figura 4.19	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.	57
Figura 4.20	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.	58
Figura 4.21	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em córtex cerebral de ratos jovens.	59
Figura 4.22	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) e da isovalerilglicina (IVG) sobre a oxidação do DCFH-DA em córtex cerebral de ratos jovens.....	60
Figura 4.23	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre o conteúdo de grupamentos sulfidril em córtex cerebral de ratos jovens.....	62
Figura 4.24	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre a medida de grupos sulfidril em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.....	63
Figura 4.25	Efeito <i>in vitro</i> do ácido isovalérico (IVA) sobre a formação de carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens.....	65
Figura 4.26	Efeito <i>in vitro</i> da isovalerilglicina (IVG) sobre a formação de carbonilas em córtex cerebral de ratos jovens.....	66